Aus der I. Medizinischen Klinik der Städtischen Krankenanstalten Nürnberg
Vorstand o. Prof. Dr. D. Jahn
und
aus der Chirurgischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor Prof. Dr. W. Dick

Beitrag zur Frage des elektrophoretischen Heparin-Nachweises

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

1962

vorgelegt von

FRANZ SCHMIDL

aus Preßnitz

7245

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549606_0005

Aus der I. Medizinischen Klinik der Städtischen Krankenanstalten Nürnberg
Vorstand o. Prof. Dr. D. Jahn
und
aus der Chirurgischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor Prof. Dr. W. Dick

Beitrag zur Frage des elektrophoretischen Heparin-Nachweises

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

FRANZ SCHMIDL

aus Preßnitz

Dekan: Professor Dr. K. Brecht

1. Berichterstatter: Dozent Dr. P. Matis

2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Dick

Inhalt

A. Einleitung und Problemstellung 5

B. Material und Methodik 10

1. Reagenzien und Apparatur 10
2. Der Heparinnachweis 11
3. Eiweißfärbung 11
4. Versuchsanordnung 12
5. Verhalten der Reaktionsteilnehmer 12

C. Ergebnisse 17

1. Metachromasie unter verschiedenen Bedingungen 17
   a) In wäßriger Lösung bei verschiedenen Farb- und Heparinkonzentrationen 17
   b) Bei Verwendung von Heparinlösungen konstanten Proteingehaltes und Variation des Farbstoffgehaltes 17
   c) Bei Verwendung von Heparinlösungen verschiedenen Proteingehaltes 17
   d) In fibrinogenhaltigen Systemen 18
   e) Bei Verwendung von Plasma und Serum verschiedenen Heparingehaltes 18
   f) Überlagerung der metachromatischen Zone durch Albumin . . . 18
2. Heparindirektfärbung 22
3. Reaktion Heparin — Toluidin 23
   a) Heparinwanderung gegen Toluidinblaulösung konstanter Konzentration 23
   b) Heparinwanderung gegen Toluidinblaulösung verschiedener Konzentration 26
4. Reaktion Heparin — Protaminsulfat 28
   a) Heparinwanderung gegen Protaminsulfat verschiedener Konzentration 28
   b) Wanderung eines Heparin-Protaminsulfat-Komplexes 33
5. Reaktion Heparin — Thrombin 35
6. Heparinnachweis im Plasma und Serum 37

D. Diskussion der Ergebnisse 41

E. Zusammenfassung 47

F. Literatur 49

A. Einleitung und Problemstellung

Eine erfolgreiche Bekämpfung thromboembolischer Zustände ist erst möglich geworden, seitdem man mit *Antikoagulantien* eine vorsorgliche oder therapeutische Gerinnungshemmung induzieren kann (26). Man unterscheidet hier *mit gerinnungsaktiven Proteinen des Blutes direkt reagierende Stoffe,* im wesentlichen die Heparine, (synthetische) Heparinoide und seltene Erden, sowie *mittelbar* die Bildung von Gerinnungsfaktoren in der Leber und damit die *Blutgerinnung beeinträchtigende Stoffe* vom Typ des Dicumarols*. Der Einheit von Gefäß und Gefäßinhalt entsprechend, wirken all diese Stoffe nicht nur auf die Blutgerinnung, sondern auch auf die Gefäßwand (80, 89). Die zunehmende Beachtung der Gerinnungsverhältnisse und ihrer Beeinflußbarkeit ist zwar im wesentlichen wohl durch die Thromboembolieforschung gefördert worden, trägt letztlich aber der *fundamentalen Bedeutung des Gerinnungsprozesses für alle Lebensvorgänge* Rechnung.

Der Gerinnungsvorgang kommt uns gemeinhin, eine Notfallfunktion erfüllend, im Dienste der *Blutstillung* zu Bewußtsein, desgleichen im Falle einer *„Blutstillung am falschen Ort"* — im Zusammenhang mit den thromboembolischen Komplikationen.

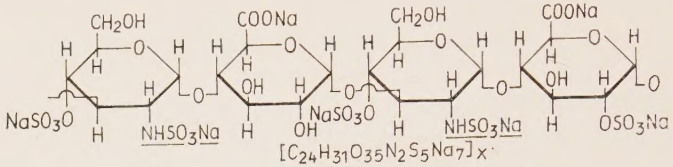
Von nicht minder großer Bedeutung ist aber die *ubiquitär und kontinuierlich ablaufende* latente (67—69) Gerinnung. Sie gewährleistet die Aufrechterhaltung der Eupermeabilität [s. hierzu auch (90)]. Man kann eine *unerwünschte,* unphysiologische „Makrogerinnung" durch Antikoagulantien hemmen. Die latent ablaufende *„Mikrogerinnung"* muß durch bestimmte Steuerungsmechanismen des Organismus, u. a. auch *durch ein physiologischerweise stets vorhandenes, körpereigenes Antikoagulans,* equilibriert sein.

Dieses physiologische Antikoagulans ist das Heparin, dessen Bedeutung nach seiner Entdeckung durch M a c L e a n im Jahre 1916 für die Induzierung einer therapeutischen oder vorsorglichen Gerinnungshemmung zwar frühzeitig erkannt, dessen klinische Verwendung aber erst Mitte der dreißiger Jahre möglich geworden ist (4, 42, 60, 66, 80, 83).

---

* Daß in neuester Zeit *fibrinolytisch* bzw. *thrombolytisch* wirkende Stoffe unsere therapeutischen Möglichkeiten bereichern, sei hier nur erwähnt. Die Wirkung von Antikoagulantien und Fibrinolytika überschneidet sich insofern, als erstere schon vermöge ihrer Gerinnungshemmung das fibrinolytische Potential des Organismus besser zur Geltung bringen lassen. Die Heparin(oid)e wirken zudem *selbst* auch fibrinolyseördernd (81, 100, 101).

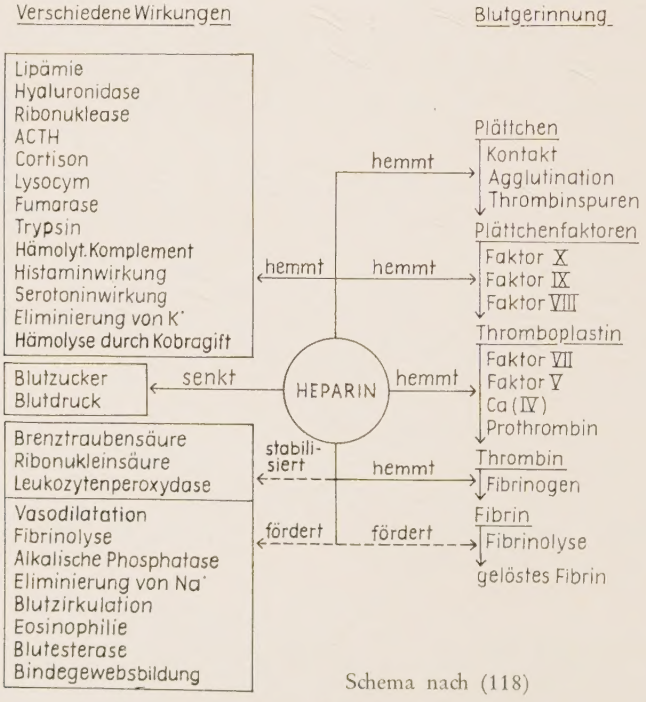
Heparin ist keine einheitliche Substanz (58, 105, 109, 118), es kann elektrophoretisch in mindestens zwei Fraktionen unterteilt werden; Neben α-Heparin mit α-glukosidisch gebundenen Zuckerresten finden sich in Organextrakten Galaktosamin enthaltende β-Heparine mit β-glukosidischen Bindungen (75).



Heparinformel nach (122)

Heparin läßt sich aus Mastzellen als wasserlöslicher *Lipoproteinkomplex* isolieren, dessen elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit 5,4 × 10^{-5} cm^2 Volt/sec beträgt (8, 25).

Das gleichzeitige Erscheinen von Heparin und Histamin im Blut deutet darauf hin, daß Plasmaheparin und Plasmahistamin denselben Ursprung haben könnten. So soll Heparin in den Mastzellen auch in einem Komplex mit Histamin (115) gespeichert werden.



Schema nach (118)

Über den *Mechanismus der Heparinabgabe* aus seinen Bildungsstätten bzw. *über einen evtl. adäquaten Reiz für diese Abgabe* [s. hierzu (82, 108, 116)] ist nichts Sicheres bekannt.

Bei der Vielzahl der dem Heparin zugeschriebenen Wirkungen [z. B. (118), ums. Schema] auf Gefäßwand, Plasmafaktoren und Blutzellelemente [s. u. (80)], insbesondere die Thrombozyten (40), muß eine wie immer geartete Inaktivierung oder Vermehrung körpereigenen Heparins für den Organismus eine gewisse Bedeutung haben.

Die Angaben über den Heparinspiegel des Plasmas schwanken von 4 bis 5 γ/ccm (28), 1—2 γ/ccm (30, 38, 94, 95), 0,1 γ/ccm (104), 0,05 γ/ccm (17) bis zu 0,01 γ/ccm (57), wobei die Identifizierung als Heparin zudem nicht immer gesichert sein dürfte.

Heparin geht als saures Mukopolysaccharid mit *Eiweißkörpern, organischen Basen* und *basischen Farbstoffen* Verbindungen ein. Diese Tatsache einer Komplexbildung ist auch für den Heparinnachweis von großer Bedeutung.

Bei Reaktion von Heparin mit *Eiweißkörpern* (13, 31, 50) können die anorganischen Kationen des Heparins unter Bildung eines Niederschlages durch das Protein ersetzt werden, wobei diese Verbindung dann einer *echten Salzbildung* entspricht. *Lösliche Heparin-Eiweiß-Verbindungen* lassen sich hingegen nur an bestimmten Änderungen der Eiweißkörper bzw. des Heparins nachweisen. Bei einem Enzym schwindet die Enzymaktivität (84, 123). Protamine, Histone beeinträchtigen ihrerseits bei Reaktion mit Heparin dessen gerinnungshemmende Wirkung. Gerinnungsaktive Eiweißkörper, *Gerinnungsfaktoren bzw. Kofaktoren* nehmen eine Mittelstellung ein. *Lipide* sollen die Affinität des Eiweißes für Heparin fördern.

Heparin reagiert nach dem Massenwirkungsgesetz mit komplexen *organischen Basen,* z. B. Histaminen, Alkaloiden und *basischen Farbstoffen.*

Die durch Heparin hervorgerufene Metachromasie (59, 61) ist eine *direkte Folge der Komplexbildung* mit entsprechenden Farbstoffen. So bindet *Toluidinblau* unter *der Erscheinung der Metachromasie* das Heparin quantitativ (47, 85). Es ist somit prinzipiell auch zur Aufhebung des Heparineffektes geeignet, allerdings schlecht verträglich (79).

Ein metachromatischer Effekt wurde erstmals 1875 (23, 45, 63) beobachtet. Seit P. Ehrlich (27) versteht man hierunter die Tatsache, daß bestimmte Farbstoffe bestimmte histologische Elemente in einem anderen Farbton als der Eigenfarbe anfärben, oder: mit der gleichen Farbe werden verschiedene Gewebeteile verschieden angefärbt (70, 71).

Gewebeelemente, die sich durch die metachromatischen Farbstoffe abweichend färben, sind chromotrope Elemente.

Metachromasie tritt auf, sobald man den Farblösungen eine *chromotrope Substanz* zufügt.

Metachromatisch sind all jene basischen *Farbstoffe*, die eine freie primäre Aminogruppe besitzen (3, 25, 41). So kann die Bildung einer metachromatischen Farbe nach Reaktion von Heparin mit einer großen Anzahl von Farbstoffen beobachtet werden (Azur A, Neutralrot, Brillantkresylblau, Kresylviolett, Bismarck-Braun usw.). Am meisten ist allerdings Toluidinblau* wegen des deutlichen Farbwechsels von blau zu rot benutzt worden. Das Ausmaß der Verschiebung der Absorptionsbande ist bei allen Farbstoffen aber etwa gleich.

Der Gruppe der *chromotropen Substanzen* gehören die Polysaccharid-Schwefelsäureester (71) an. Die Metachromasie** tritt bei diesen Stoffen um so empfindlicher auf, je höher der Polymerisationsgrad dieser Stoffe ist (3).

Die Methoden zur *Heparinbestimmung* nach *Isolierung aus Plasma* (30, 56, 87, 94, 95) bzw. aus *Gewebe* (5, 9, 33, 34, 35, 48, 78, 86, 105, 111) basieren einmal auf der Erfassung der *Gerinnungshemmung* (49, 52, 60, 62), wobei als Testsystem Nativplasma, rekalzifiziertes Plasma (76, 98), ggf. unter Einbeziehung von Thrombin (52, 109), in Betracht kommen.

Chemische Methoden bedienen sich der Metachromasie, wobei einmal der in Lösung verbleibende (22, 73) bzw. der gefällte Farbstoff (36, 37) erfaßt bzw. eine diesbezügliche Differenzbestimmung (73) vorgenommen wird.

Zur Identifizierung des Heparins hat sich die Papierchromatographie sowie Auskristallisieren als *Bariumsalz* bewährt (54).

Zur *direkten Heparinbestimmung im Blut* käme die *Gerinnungszeit* in Betracht (51, 53), sofern Heparin die einzige Variable ist.

Die *Protamintitration* (1, 50) ist nur dann für Heparin spezifisch, wenn eine deutlich verlängerte Gerinnungszeit durch Protamin reduziert wird. Das Protaminäquivalent der Serummukoproteine beträgt nämlich 2,7 mg/ccm (93), so daß *der Test für die Bestimmung physiologischer Heparinwerte ausscheidet.*

Mit dem Protamintoleranztest (12) soll die Hyperheparinämie besser zu erfassen sein.

Klinisch am meisten verwandt sind *Bestimmungen des Heparinantithrombins* (64, 97, 113, 120, 121).

---

* Toluidinblau soll mit Heparin keine Metachromasie ergeben (20), obgleich es Heparin bindet und auch seine Gerinnnugsaktivität hemmt (54). Die Reaktion scheint vielmehr von einer Veränderung des Toluidinblaus bei Lagerung herzurühren, bei der eine Farbe entsteht, die spektrofotometrisch nicht von Azur A zu unterscheiden ist. Toluidinblau Merck setzt sich aus den blauen Thiazinfarbstoffen I und II, die dem Methylenblau nahe verwandt sind (3, 7, 96), zusammen

** Die Reaktion hängt zunächst von der Salzbildung zwischen den Aminogruppen des Farbstoffes und den sauren Gruppen des Heparins ab. Eine weitere Verschiebung der Absorptionsbande ist die Folge von sekundären Veränderungen zwischen den Farbmolekülen. Die Reaktion wird demnach durch Faktoren beeinflußt, die den Assoziationsgrad der Heparinkomplexe (pH, Ionen, Eiweiß) bzw. die Bildung sekundärer Valenzen (Erhitzen, Alkohol) beeinflussen. Wesentlich ist, daß die pH-Werte unter 10 liegen müssen. Farbveränderungen bei pH-Werten über 10 können nicht mehr als Metachromasie gedeutet werden.

Bei den *Heparintoleranztesten* wird das Gerinnungssystem in vivo (110) oder in vitro (75, 107) einer zusätzlichen genormten Heparinbelastung unterworfen. Bei vorhandenem Heparin wiegt das zugegebene Heparin naturgemäß schwerer. Allerdings ist hierbei zu beachten, *daß jeder Gerinnungsdefekt* durch eine zusätzliche Heparingabe verstärkt wird [s. hierzu auch (4, 91, 112)].

Man hat deshalb von der Gerinnungsanalyse her zur angenäherten Erfassung des Heparingehaltes eine Kombination von Thrombinzeit, Thromboplastinzeit, Vollblutgerinnungszeit und Rekalzifizierungszeit in Zitratblut und Zitratplasma, ergänzt durch thrombelastographische Untersuchungen, gefordert (77).

Tatsächlich lassen eine oder mehrere der erwähnten Reaktionszeiten noch keine Beurteilung hinsichtlich des Heparingehaltes einer Blutprobe zu. Eine *nähere Definition gerinnungsanalytischer Aussagen* durch eine Bestimmung der Metachromasie wäre deshalb durchaus wünschenswert, sofern die technischen Anforderungen nicht zu groß werden.

Mir war deshalb, von früheren eigenen Beobachtungen und orientierenden Versuchen ausgehend* in Zusammenarbeit mit in gleicher Richtung laufenden Untersuchungen an der Chirurgischen Universitätsklinik in Tübingen (Doz. Dr. Matis, Oberarzt Dr. Nagel) die Aufgabe gestellt worden, die Möglichkeiten eines *direkten elektrophoretischen Heparinnachweises auf Grund der metachromatischen Eigenschaften des Heparins* zu überprüfen. Es war hierbei von den *Möglichkeiten einer unmittelbaren Betrachtung*, unter Verzicht auf kompliziertere technische Maßnahmen (wie Elution, fotometrische Bestimmungen usw.) auszugehen.

---

* Wird heparinhaltiges Material zur Papierelektrophorese aufgetragen, so tritt innerhalb eines Toluidinblau-Striches, mit welchem der Elektrophoresestreifen präpariert worden war, Metachromasie, die direkt zu beobachten ist, auf.

B. Material und Methodik

1. Reagenzien und Apparatur

Es gelangten folgende *Reagenzien* zur Verwendung:

Albumin: Behringwerke 1,0 in Substanz
Globulin: γ-Globulin Behringwerke 16%ige Lösung
Albumin-γ-Globulin-Gemisch, enthaltend: 4% Albumin + 2% γ-Globulin
Thrombin: Topostasin Roche 3000 NIH, entsprechend ca. 70 mg
Fibrinogen: Rinderfibrinogen Behringwerke à 60 mg
Toluidinblau: Toluidinblau Merck, Stammlösung 100 mg% in Aqua dest.
Azur A: Stammlösung wie oben
Plasma und Serum eines gesunden Probanden
Heparin: Liquemin Roche, 5000 IE/ccm
Protaminsulfat: Protaminsulfat Roche 1%ige Lösung
Puffer: Trispuffer pH 8,9.

Gerät: Die Versuche wurden zunächst in einer selbstkonstruierten Apparatur, später in dem Gerät von B e n d e r und H o b e i n und schließlich dem EEL-Gerät (Evans-Electroselenium-LTD) bei einer Stromstärke von 0,4 mA/cm Streifenbreite durchgeführt.

Ursprünglich wurde Papier Sch. u. Sch. Nr. 2043a, später jedoch das etwas *saugfähigere* Papier Nr. 2043b mgl verwandt. Die Papier*streifen* hatten eine *Breite* von 4 cm oder 2 cm und wurden, soweit erforderlich, nachträglich weiter zerschnitten und ggf. verschieden angefärbt.

Sofern nicht anders vermerkt, wurden am Startpunkt jeweils 0,05 ccm/2 cm Streifenbreite *heparin*haltigen Mediums aufgetragen. Der Heparingehalt ist in γ/ccm angegeben. Je nach Versuchsanordnung wurden in wechselnder Entfernung vom Start 0,015 ccm/2 cm Streifenbreite Toluidinblau bzw. Azur A (s. unten) bzw. 0,05 ccm/2 cm Streifenbreite Protaminsulfat u. a. m. aufgetragen.

Aus den Tabellen 1a—c sind die jeweils reagierenden Mengen ersichtlich.

2. Der Heparinnachweis

Zum Nachweis des Heparins wurden zwei Wege beschritten:

1. *Auftreten einer Metachromasie* im Toluidinblau. Sofern nicht anders angegeben, wurden in wechselndem Abstand vom Startpunkt jeweils 0,015 ccm einer 200- bis 12,5mg% igen *Toluidinblausösung* bzw. Azur-A-Lösung aufgetragen. Es kam hierbei, im Sinne der Problem- und Aufgabenstellung, auf die *unmittelbare Betrachtung* der metachromatischen Verfärbung im *auffallenden* oder durchfallenden Licht ohne weitere instrumentelle oder präparative Maßnahmen (Elution, fotometrische Bestimmung usw.) an. Bei Beurteilung der innerhalb der Toluidinblauzone auftretenden metachromatischen Färbung wurde die Intensität bewertet, die vor allem bei niedriger Konzentration nicht immer mit der Schärfe der metachromatischen Linie identisch war. Die Verfärbung war im feuchten Zustand in der Kammer anders als nach Trocknen, die bei 37° C an der Luft durchgeführt worden war.

2. *Heparinfärbung des Streifens.* Wir haben die Methode von H e r e m a n s und V a e r m a n (44), da sie nach W i n t e r s t e i n (119) die besten Ergebnisse liefern soll, angewandt.

Lösungen:

(1) Fixationsflüssigkeit: 20 Vol.% Formol und 80 Vol.% Äthanol.
(2) Alcianblau: 1 g gelöst in 10 Vol. H_2O und 90 Vol. Eisessig.
(3) Eisessig.

Ausführung: Streifen 30 Minuten bei 110 C trocknen, danach 15 Minuten in (1) fixieren und anschließend bei Zimmertemperatur trocknen. Dann 5 Minuten mit (2) färben. Dann Entfärben des Hintergrundes durch Spülen in fließendem Wasser (1 Minute) und Einlegen in Eisessig (5 Minuten). Dieser Vorgang wird insgesamt 4mal durchgeführt und mit einer Spülung von 5 Minuten in Wasser abgeschlossen. Trocknen bei Zimmertemperatur.

3. Eiweißfärbung

Zur *Anfärbung von Eiweißkörpern* wurde die allgemein übliche Amidoschwarzfärbung, in einigen Fällen auch eine Azokarminfärbung verwandt.

Eiweißfärbung mit Azokarmin

Lösungen:

(1) Azokarmin: 0,25 g gelöst in 10 Vol. Eisessig und 90 Vol. Methanol
(2) Entfärbelösung: Mischung aus 10 Vol.% Eisessig und 90 Vol.% Methanol.

Ausführung: Der bei Zimmertemperatur getrocknete Streifen wird 10 Minuten mit (1) gefärbt und anschließend 4mal 5 Minuten in (2) entfärbt. Trocknen bei Zimmertemperatur.

Eiweißfärbung mit Amidoschwarz

Lösungen:

(1) Methanol gesättigt mit Amidoschwarz 10 B

(2) Entfärbelösung: Mischung aus 10 Vol.% Eisessig und 90 Vol.% Methanol.

Ausführung: Der bei Zimmertemperatur getrocknete Streifen wird 10 Minuten mit (1) gefärbt und anschließend 5mal je 10 Minuten in (2) entfärbt. Trocknen bei Zimmertemperatur.

4. Versuchsanordnung

Die Untersuchungen wurden jeweils so angesetzt, daß eine bestimmte Fragestellung in *einem* Arbeitsgang mit den gleichen Reagenzien unter gleichen Arbeitsbedingungen *in einer* Kammer durchgeführt wurde.

Schwankungen der Stromstärke, Öffnen der Kammer bei erforderlich werdendem früheren Herausnehmen eines Streifens, unvermeidbare Fehler beim Ansetzen der z. T. hochgradigen Heparinverdünnungen — alle diese Punkte lassen an verschiedenen Tagen ermittelte Ergebnisse nicht immer exakt vergleichbar erscheinen. Deshalb mußten verschiedene Befunde wiederholt erhoben werden. Im folgenden sind dann für die einzelnen Gruppen jeweils als repräsentativ erachtete Versuchsanordnungen abgebildet und besprochen.

Zum Teil wurden nur Ausschnitte reproduziert bzw. die Streifen in der Höhe beschnitten. Bei Zusätzlichen Verkleinerungen ist der Maßstab immer angegeben. Die Anordnung wurde so gewählt, daß Heparin vom Betrachter aus immer nach rechts und Protaminsulfat immer nach links wandert.

5. Verhalten der Reaktionsteilnehmer

Das sich unter den gewählten Versuchsbedingungen ergebende elektrophoretische Verhalten der Reaktionsteilnehmer ist aus Abb. 1—5 ohne weiteres ersichtlich.

Da sich Heparin auf Grund seiner erheblich größeren Beweglichkeit im elektrischen Feld sehr schnell auch vom schnellstwandernden Eiweißkörper, dem Albumin, absetzt, war es nicht nötig, die Elektrophorese über einen Zeitraum von 10—14 Stunden wie für die Differenzierung der Eiweißkörper auszudehnen, es genügte vielmehr eine *Laufzeit von 1—3 Stunden* mit einer *Laufstrecke von 6—11 cm für das Heparin* und *entsprechend geringerer Laufstrecke für die Eiweißkörper.* Entscheidend war immer eine *ausreichende Trennung der Heparine von den Proteinen,* obgleich sich zeigte (s. Abb. 10), daß die Über-

lagerung der metachromatischen Zone mit dem Eiweißkörper keine optische Einbuße mit sich brachte.

Die Metachromasie erscheint erst einige Minuten nach ihrem ersten Auftreten optimal ausgeprägt. Bei den Laufzeiten ist deshalb verschiedentlich neben dem Zeitpunkt der Entnahme des Streifens, noch der Zeitpunkt des ersten Auftretens der Metachromasie angegeben (z. B. 165/175 Min.

Aus nachstehenden Tabellen 1a—1c sind die jeweils *reagierenden* Heparin- (1 E = 8 γ), Toluidinblau- und Protaminsulfat-*Mengen in* γ ersichtlich:

Tab. 1a

Heparin E/ccm	γ in 0,05 ccm	γ in 0,1 ccm
20	8	16
10	4	8
5	2	4
2	0,8	1,6
1	0,4	0,8
0,5	0,2	0,4
0,25	0,1	0,2
0,125	0,05	0,1

Tab. 1b

Toluidinblau-lösung	γ in 0,015 ccm	γ in 0,3 ccm
200	30	60
100	15	30
50	7,5	15
25	3,75	7,5
12,5	1,875	3,75

Tab. 1c

Protamin γ/ccm	γ in 0,05 ccm	γ in 0,1 ccm
2000	100	200
1000	50	100
500	25	50
400	20	40
200	10	20
100	5	10
50	2,5	5
25	1,25	2,5

Bezgl. Einzelheiten der papierelektrophoretischen Methodik sei auf die übersichtliche Darstellung unter (102) verwiesen.

Abb. 1: Gegensinnige Wanderung von Protaminsulfat und Thrombin im elektrischen Feld: 0,05 ccm einer 1%igen Protaminsulfatlösung (unten) und 0,05 ccm einer Lösung von 80 NIH-Einheiten Thrombin/ccm (oben). Laufzeit 60 Min. Die Auftragungsstelle ist durch einen noch gut sichtbaren Strich bezeichnet (1/1)

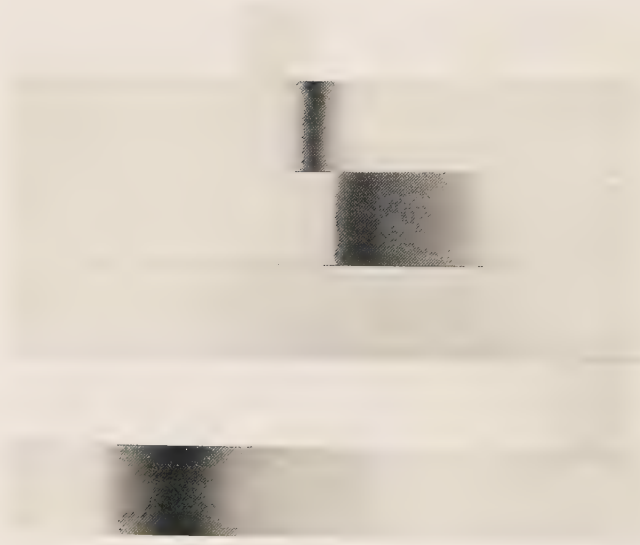


Abb. 2: Die *Wanderungsgeschwindigkeit* beträgt unter den gewählten Versuchsbedingungen für (von oben nach unten) Toluidinblau —10 mm, Fibrinogen +8 mm, Albumin +31 mm, Thrombin +33 mm, Heparin +62 mm, Protaminsulfat —31 mm bei einer *Laufzeit* von 120 Minuten

A b b. 3 : *Heparin* (linke Bildhälfte) nach rechts und *Protaminsulfat* (rechte Bildhälfte) nach links wandernd. Die Pfeile bezeichnen die Auftragungsstelle (1/1, Ausschnitte). Heparinfärbung, Azokarminfärbung. — 0,05 ccm einer 1/20/0igen Lösung Protaminsulfat sind bei dem hier wiedergegebenen Versuch nach 30 Minuten 10 mm, nach 60 Minuten 17 mm, nach 90 Minuten 22 mm, nach 140 Minuten 33 mm vom Startpunkt entfernt. Die Startstelle selbst ist eiweißfrei nach 75 Minuten. *Heparin* (0,05 ccm einer wäßrigen 5 E/ccm enthaltenden Lösung) wandert unter denselben Bedingungen mit der vordersten Front nach 15 Minuten 13—15 mm, nach 30 Minuten 23—30 mm, nach 60 Minuten 33—45 mm, nach 90 Minuten 47—55 mm, nach 120 Minuten 55 mm. Diese Zahlen schwanken naturgemäß und hängen von der Konzentration, dem Feuchtigkeitsgrad usw. ab

A b b. 4 : 0,1 ccm einer 20 E/ccm Liquemin (oben), Heparin Novo (Mitte) und Heparin Vitrum (unten) enthaltenden wäßrigen Lösung. Laufzeit 2 Stunden. Heparinfärbung. Die drei Präparate zeigen praktisch die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit und ähnliche Konfiguration der angefärbten Fläche (1/1). Bei dieser und den folgenden Abbildungen zeigt ein aufrecht stehender Pfeil i. d. Regel am linken Bildrand die Heparin-Auftragungsstelle an

↑

Abb. 5: Pherogramm des in unseren Untersuchungen verwendeten Albumin-γ-Globulin-Gemisches bzw. Normalplasmas nach 6stündiger (oben) und 12stündiger (unten) Laufzeit. Amidoschwarz ($^{6}/_{10}$)

C. Ergebnisse

1. Metachromasie unter verschiedenen Bedingungen

a) *In wäßriger Lösung bei verschiedenen Farb- und Heparinkonzentrationen:* Am Startpunkt wurden wäßrige, verschieden konzentrierte Heparinlösungen und im Abstand von 5,5 cm jeweils eine verschieden konzentrierte Toluidinblau- bzw. Azur-A-Lösung aufgetragen (Abb. 6). Die metachromatische Zone ist bei Reaktion einer Heparinlösung (1 E ccm) mit 100mg%iger und 50mg%iger Toluidinblaulösung praktisch gleich. Die 25mg%ige Toluidinblaulösung ergibt keine brauchbareren Werte. Eine niedrigere Heparinkonzentration (1/4 E/ccm) ergibt bei Reaktion mit 50mg%iger Toluidinblaulösung eine deutlichere metachromatische Zone als mit 100mg%iger Toluidinblaulösung. Die Verwendung von Azur A läßt unter den gewählten Bedingungen die Metachromasie nicht besser hervortreten.

Im durchfallenden Licht lassen sich auf diese Weise noch 1/8 E/ccm Heparin sehr gut erkennen, im auffallenden nicht immer mit Sicherheit. 1/4 E/ccm ist aber immer gut zu erkennen. Verschiedene Heparine zeigten bei diesen Untersuchungen die gleiche Aktivität.

b) *Bei Verwendung von Heparinlösungen konstanten Proteingehaltes und Variation des Farbstoffgehaltes:* Am Startpunkt wurde eine Albumin-γ-Globulin-Lösung konstanten Heparingehaltes aufgetragen und im Abstand von 5,5 cm eine verschieden konzentrierte Toluidinblaulösung. Entnahme der Streifen bei Auftreten der Metachromasie (Abb. 7). Die metachromatische Zone ist bei der 50mg%igen Toluidinblaulösung am besten zu erkennen.

c) *Bei Verwendung von Heparinlösungen verschiedenen Proteingehaltes:* Am Startpunkt werden verschieden konzentrierte Albumin- und γ-Globulin-Lösungen jeweils konstanten Heparingehaltes und im Abstand von 4 cm eine 50mg%ige Toluidinblaulösung aufgetragen. Zusätzlich Eiweißfärbung (Abb. 8). Die metachromatische Zone innerhalb des Toluidinblauareals ist mit zunehmender Proteinkonzentration, bei Albumin mehr als bei γ-Globulin, schlechter zu erkennen.

d) *In fibrinogenhaltigen Systemen:* Am Startpunkt werden 0,05 ccm eines fibrinogen- (etwa 350 mg%) haltigen und fibrinogenfreien Albumin-γ-Globulin-Gemisches sowie eine Fibrinogenlösung 1000 mg% aufgetragen (Abb. 9). Man erkennt keine sichere, allenfalls nur eine ganz geringfügige Minderung der metachromatischen Zone im Bereich des Toluidinblaus.

e) *Bei Verwendung von Plasma und Serum verschiedenen Heparingehaltes:* Heparin, physiologischer Kochsalzlösung oder einem Albumin-γ-Globulin-Gemisch beigegeben, erzeugt in Toluidinblau (s. hierzu auch Tab. 1b und 1c) eine *scharf abgrenzbare* metachromatische Zone. Die gleiche Heparinmenge *Serum* oder *Plasma* beigegeben, läßt eine metachromatische Zone, wenn überhaupt, dann *nur viel weniger deutlich* abgegrenzt hervortreten. Dieser Effekt kann nicht durch Überlagerung des Toluidinblauareals mit Eiweißkörpern bedingt sein, da sich diese in vielen dieser Fälle auch noch weit kathodenwärts befinden.

Nach *intravenöser Injektion* von 10 000—20 000 E Heparin findet sich die erwartete Metachromasie nur angedeutet; sie ist jedenfalls, wenn überhaupt vorhanden, viel geringer ausgeprägt, als nach der zugeführten Heparinmenge zu erwarten gewesen wäre.

Dieser *metachromasiedämpfende Effekt* ist im Plasma mehr ausgeprägt als im Serum. Es ist hierbei eine Beimengung von *Na-Zitrat* in der klinisch üblichen Konzentration unerheblich.

f) *Überlagerung der metachromatischen Zone durch Albumin:* Das heparinhaltige Albumin-γ-Globulin-Gemisch wird in verschiedenem Abstand von Toluidinblau aufgetragen. Auftreten der Metachromasie demnach bei verschieden langer Laufzeit; zusätzlich Eiweißfärbung (Abb. 10). Die in erster Linie in Betracht kommende Überlagerung des Toluidinblaustreifens mit Albumin ist ohne Bedeutung für die Ausbildung der metachromatischen Zone. Die Metachromasie tritt auch in den am weitesten anodenwärts befindlichen Toluidinbereichen auf: Die schnell wandernden Toluidinanteile geben ebenfalls Metachromasie.

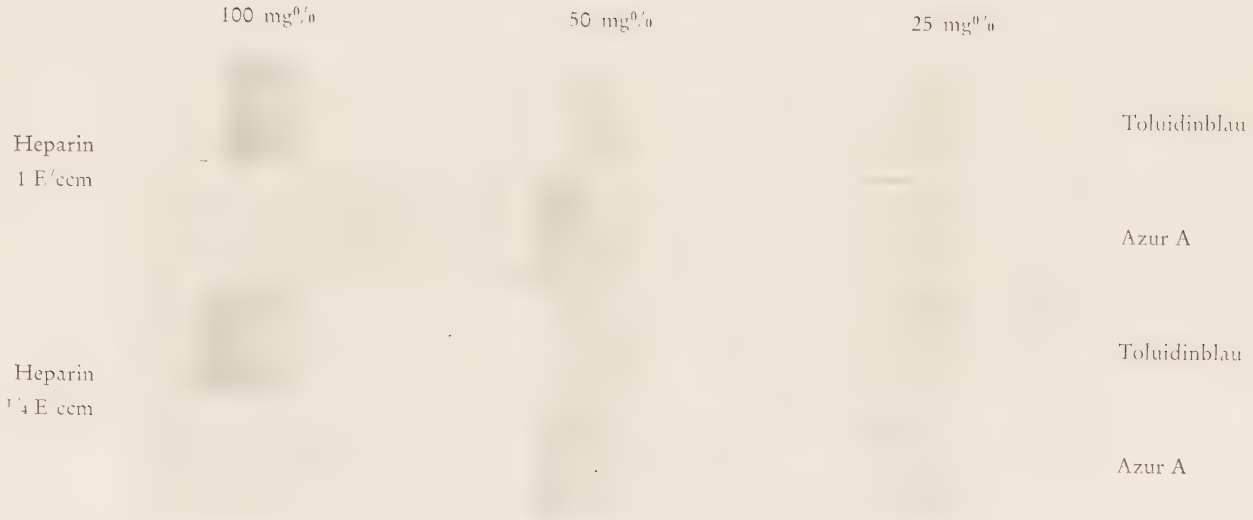


Abb. 6: Metachromatische Zone, erzeugt durch eine wäßrige *Heparin*lösung, enthaltend 1 E bzw. 1/4 E Heparin ccm in einer 100-, 50- und 25mg% igen *Toluidinblau*- bzw. einer 50- und 25 mg% igen *Azur-A*-Lösung: Abstand zwischen Heparin- und Toluidin-Auftragungsstelle 5,5 cm, Laufzeit 60—120 Minuten. Es reagieren jeweils 0,4 γ Heparin in den oberen beiden Reihen und 0,1 γ Heparin in den beiden unteren Reihen mit 15 γ, 7,5 γ und 3,75 γ Toluidinblau, bzw. 7,5 γ und 3,75 γ Azur A (3/2; Ausschnitte)

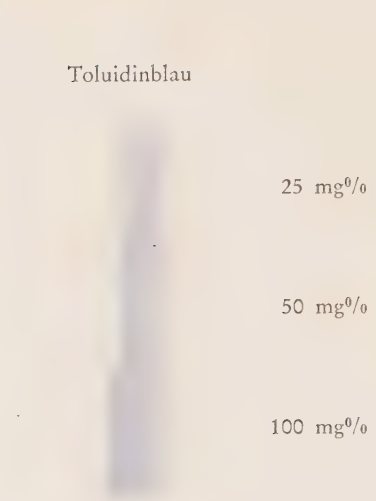


Abb. 7: Metachromatische Zone, erzeugt durch 0,1 ccm eines 1 E/ccm Heparin enthaltenden Albumin-γ-Globulin-Gemisches in 0,03 ccm eines 25mg%igen, 50mg%igen, 100mg%igen Toluidinblaulösung. Abstand Heparin- und Toluidinblau-Auftragungsstelle 5,5 cm. Laufzeit 80 Minuten. Es reagieren jeweils 0,8 γ Heparin mit (von oben nach unten) 15 γ, 7,5 γ, 3,75 γ Toluidinblau. Die 50mg%ige Toluidinblaulösung ergibt die am schärfsten abgegrenzte metachromatische Verfärbung (3/4)

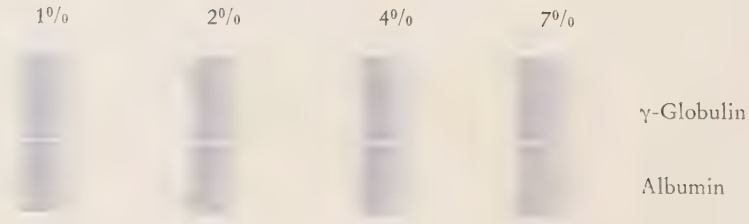


Abb. 8: Metachromatische Zone, erzeugt durch 0,1 ccm einer 2 E *Heparin*/ccm enthaltenden 1%igen, 2%igen und 7%igen γ-*Globulinlösung* und *Albuminlösung* in 0,03 ccm einer 50mg%igen Toluidinblaulösung. Abstand zwischen Heparin-Auftragungsstelle und Toluidinblau-Auftragungsstelle 4 cm. Laufzeit 60 Minuten (1/1; Ausschnitte). Es reagieren jeweils 1,6 γ Heparin mit 7,5 γ Toluidinblau

Abb. 9: Ausbildung einer metachromatischen Zone durch 0,05 ccm einer 1 E Heparin/ccm enthaltenden Lösung von Albumin-γ-Globulin ohne (oberer Streifen) und mit Fibrinogen 350 mg% (mittlerer Streifen), sowie Fibrinogen 1000 mg% in 0,015 ccm Toluidinblau 50mg%ig. Abstand Heparin- und Toluidinblau-Auftragungsstelle 5,5 cm; Laufzeit 85 Min. (1/1; Ausschnitte)

Abb. 10: Metachromatische Zone durch 2 E *Heparin/ccm Albumin-γ-Globulin-Gemisch* in einer 100mg%igen Toluidinblaulösung. Abstand zwischen Heparin- und Toluidinblau-Auftragungsstelle 2,5—6 cm. Laufzeit 20—85 Minuten. Bei längerer Laufzeit Verbreiterung des Toluidinblaustreifens. In den obersten Streifen, bei denen die metachromatische Zone durch das Albumin überdeckt ist (s. die Amidoschwarzfärbung), ist die Metachromasie genauso gut zu sehen wie in den unteren Streifen (1/1)

2. Heparindirektfärbung

Abbildung 11 vermittelt Anhaltspunkte über die Empfindlichkeit der Direktfärbung von Heparin in wäßriger Lösung nach einer Laufzeit von 2—4 Stunden. Bei der gewählten Versuchsanordnung lassen sich im *auffallenden Licht* noch 1/4 E und im *durchfallenden Licht* 1/8 E sehr gut nachweisen. Das entspricht einer *absoluten Menge von 0,1 γ!*

Abb. 11: 0,05 ccm einer wäßrigen Heparinlösung, enthaltend 2 E, 1 E, 1/2 E, 1/4 E und 1/8 E/ccm. Heparinfärbung. Laufzeit 60 Minuten. 1/4 E/ccm ist bei auffallendem, 1/8 E/ccm in durchfallendem Licht noch einwandfrei zu erkennen (3/4)

^ Liquemin

3. Reaktion Heparin — Toluidin

a) *Heparinwanderung gegen Toluidinblau konstanter Konzentration:* An Startpunkt wird eine wäßrige Heparinlösung und im Abstand von 5,5 cm eine Toluidinblaulösung aufgetragen, die von Heparin durchwandert werden soll.

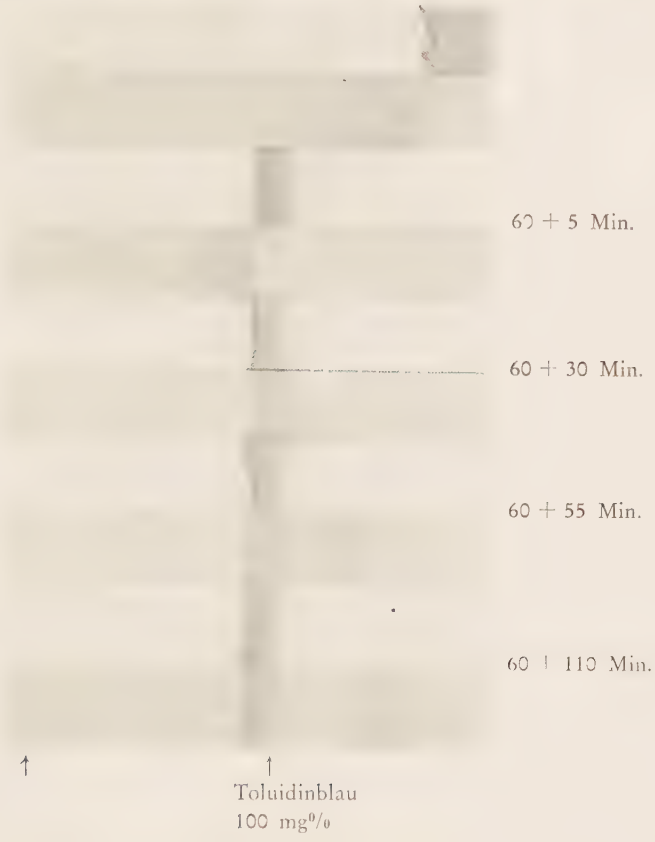


Abb. 12: Am Startpunkt sind jeweils 0,05 ccm einer 10 E Heparin/ccm enthaltenden wäßrigen Lösung, und im Abstand von 5,5 cm 0,015 ccm einer 100 mg%igen Toluidinblaulösung aufgetragen. Im obersten (Kontroll-)Streifen sind Heparin- und Toluidinblau- (200 mg%) Auftragungsstelle 10 cm entfernt. Auftreten einer metachromatischen Zone hier nach 170/185 Min. Im Toluidinblau 5,5 cm vom Startpunkt aufgetragen, tritt eine metachromatische Zone bereits nach 60 Min. auf. An diesen Stellen reagieren jeweils 4 γ Heparin mit 15 γ Toluidinblau. Diese Streifen wurden 5 Min., 30 Min., 55 Min. und 110 Min. nach Auftreten der metachromatischen Verfärbung, d. h. nach einer Laufzeit von insgesamt 65, 90, 115 und 170 Min., entfernt. Die Heparinfärbung (in der Abbildung dunkel) gibt besondere Aufschlüsse: Sie zeigt das „Anstauen" des Heparins vor den Toluidinstreifen (↑), dann das Eindringen in das Toluidinblauareal und schließlich dessen Passieren (↙). Zum Zeitpunkt, da im Bereich der Kontrolle das Heparin 8,3 cm zurückgelegt hat, befindet es sich nach Durchwanderung des Toluidinblaustreifens 7,6 cm vom Start entfernt (²/₃)

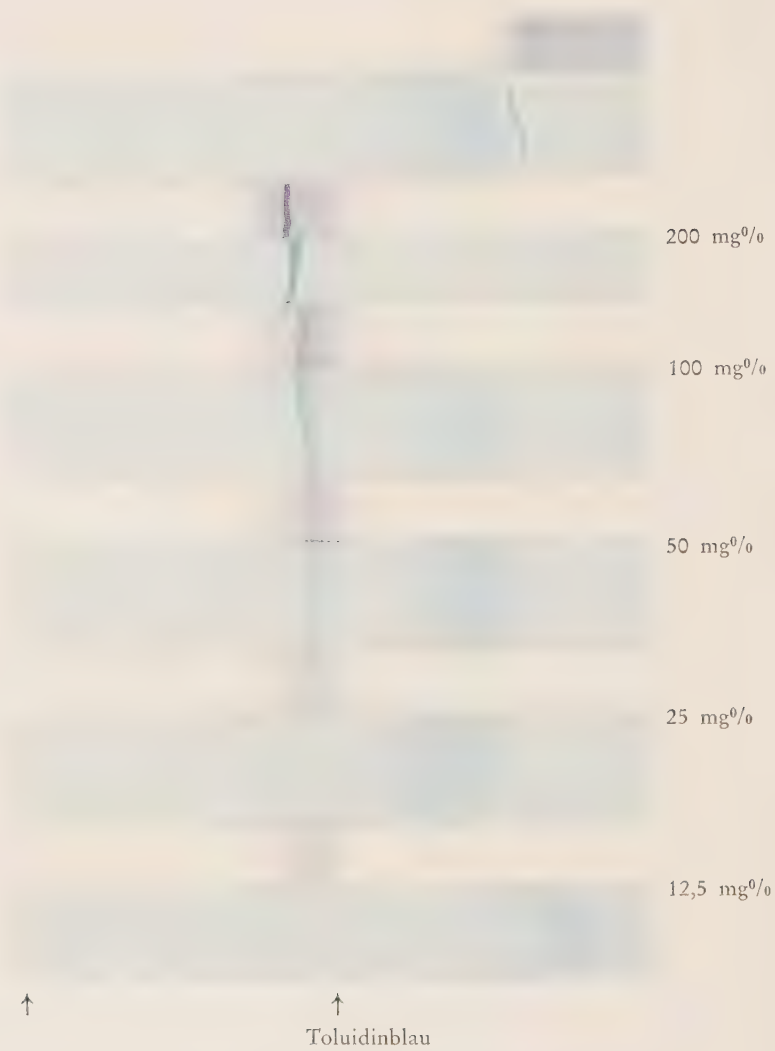


Abb. 13: Am Startpunkt sind jeweils 0,05 ccm einer 10 E Heparin/ccm enthaltenden wäßrigen Lösung aufgetragen. Im obersten (Kontroll-)Streifen 11 cm vom Start entfernt eine 200mg%ige Toluidinblaulösung. Auftreten einer metachromatischen Zone hier nach 210/220 Min., 8,9 cm vom Start. Auf den darunterliegenden Streifen 5,5 cm Entfernung vom Start jeweils 0,015 ccm Toluidinblaulösung fallender Konzentration. Die Laufzeit betrug durchweg 220 Min. Die 200mg%ige Toluidinblaulösung fängt bei dieser Versuchsanordnung das gesamte Heparin ab. Es reagieren hierbei 4 γ Heparin mit 30 γ Toluidinblau. Die 100mg%ige Toluidinblaulösung läßt Heparin teilweise passieren. Hier reagieren 4 γ Heparin mit 15 γ Toluidinblau. Das bei der Heparinfärbung — blaue Streifen — angefärbte Areal ist schwächer als auf den darunterliegenden Streifen (2/3)

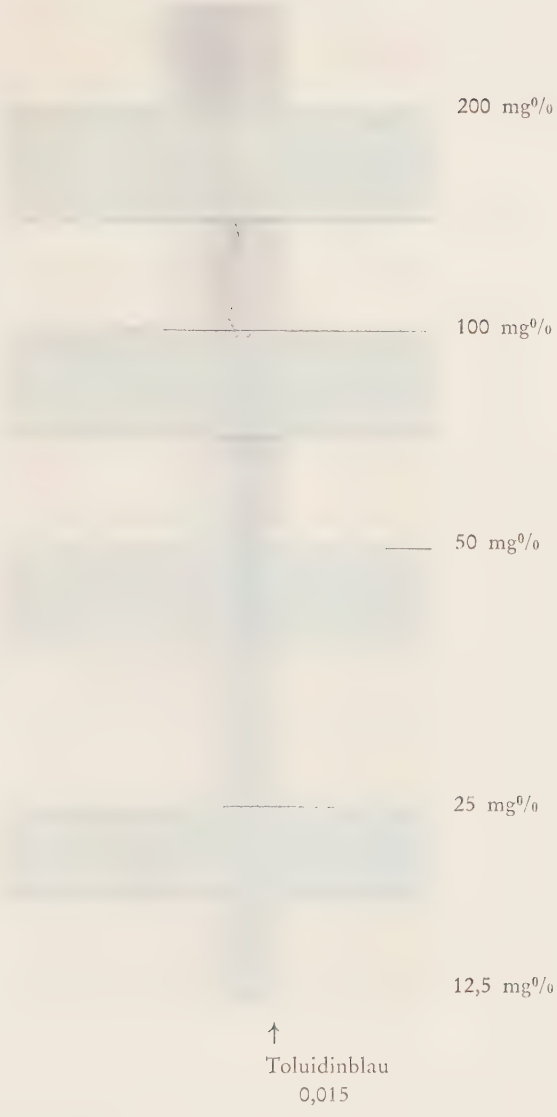


Abb. 14: Anordnung dieselbe wie in vorangehender Abb. 13. Am Startpunkt wurden jeweils 0,05 ccm einer 2 E Heparin/ccm enthaltenden wäßrigen Lösung aufgetragen. Im Kontrollstreifen (hier nicht dargestellt) ist das Toluidinblau in 11 cm Entfernung vom Start aufgetragen, in den darunter liegenden Streifen 0,015 ccm Toluidinblaulösung fallender Konzentration 5,5 cm vom Start entfernt. Die Laufzeit betrug durchweg 220 Min. In der obersten Reihe reagieren 0,8 γ Heparin mit 30 γ Toluidinblau. Bei der Heparinfärbung färbt sich noch folgender Komplex deutlich an: 0,8 γ Heparin gegen 7,5 γ Toluidinblau. In der 25mg%igen Toluidinblaulösung ist eine Metachromasie nur noch angedeutet zu erkennen (1/1; Ausschnitt)

Als Indikator für die erforderliche Laufzeit dient das Auftreten einer metachromatischen Zone in einer 10 cm von der Heparinauftragungsstelle entfernten Toluidinblaulösung (Abb. 12). Das Heparin staut sich, wie sich aus der zusätzlichen Heparinfärbung ergibt, zunächst vor dem Toluidinblau an, dringt dann in die ganze Breite der Toluidinzone ein, um sie schließlich zu durchwandern.

b) *Heparinwanderung gegen Toluidinblaulösung verschiedener Konzentration:* Am Startpunkt wird eine wäßrige Heparinlösung und im Abstand von 5 cm bzw. 5,5 cm eine Toluidinblaulösung verschiedener Konzentration aufgetragen. Sie soll vom Heparin durchwandert werden. Als Indikator für die erforderliche Laufzeit dient wieder das Auftreten einer metachromatischen Zone in einer 10 bzw. 11 cm von der Heparinauftragungsstelle entfernt aufgetragenen

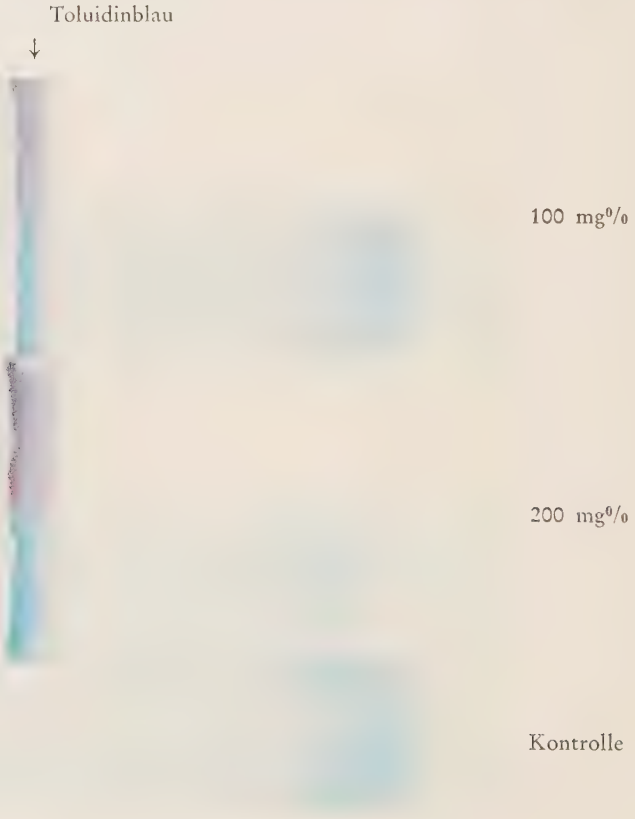


Abb. 15: Am Start sind 0,05 ccm einer 20 E Heparin/ccm enthaltenden wäßrigen Lösung aufgetragen; 5 cm entfernt 0,015 ccm einer 100mg%igen bzw. 200mg%igen Toluidinblaulösung. Die Laufzeit betrug durchweg 170 Min.; 5 cm vom Startpunkt trat sie bereits nach 45 Min. auf. Der „Subtraktionseffekt" von 200mg%iger Toluidinblaulösung gegenüber 100mg%iger Toluidinblaulösung ist deutlich zu erkennen ($^1/_1$ Ausschnitt)

Abb. 16: Am Startpunkt wurden je 0,05 ccm einer wäßrigen 2 E, 4 E, 6 E Heparin/ccm enthaltenden Lösung aufgetragen. 3 cm, 3,6 cm und 4,2 cm vom Start entfernt je 0,015 ccm einer 50mg%igen Toluidinblaulösung. Die Laufzeit betrug in allen Streifen 75 Min. Auftreten der Metachromasie in dem am weitesten links liegenden Streifen nach 25 Min. Zusätzlich Heparinfärbung. 2 E/ccm Heparin werden bereits durch den am weitesten links befindlichen Toluidinblaustreifen aufgefangen, während die 4 und 6 E/ccm enthaltende Heparinlösung auch noch im Bereich des zweiten Toluidinblaustreifens eine Metachromasie erzeugt. Es besteht, wie die Heparinfärbung zeigt, jedoch ein qualitativer Unterschied gegenüber der metachromatischen Zone im ersten Streifen (1/1; Ausschnitt)

Toluidinblaulösung (Abb. 13, 14, 15). Die zusätzliche Heparinfärbung zeigt, daß mit abnehmender Toluidinblaukonzentration zunehmend Heparin diese Toluidinblauzone durchwandert. Auffällig ist die gute Anfärbbarkeit des Toluidinblau-Heparin-Komplexes bei der Heparinfärbung.

Dem Prinzip *variabler* Toluidinblaukonzentration *eines* Streifens entspricht die Durchwanderung *mehrerer* Toluidinblaustreifen *gleicher* Konzentration. In den Abb. 16 und 17 wandert das Heparin gegen drei gleich konzentrierte Toluidinblaustreifen. Am Startpunkt wird eine wäßrige Heparinlösung,

Abb. 17: Gleiche Anordnung wie in Abb. 16. Am Startpunkt wurde eine wäßrige 2 E Heparin/ccm enthaltende Lösung (oben) und eine 6 E/ccm enthaltende Heparinlösung (unten) aufgetragen; im Abstand von 3 cm, 4 cm und 5 cm eine 50mg%ige Toluidinblaulösung. Die 2 E Heparin/ccm enthaltende Lösung bildet nur im ersten Toluidinstreifen, jene 6 E/ccm enthaltende auch noch innerhalb des dritten Toluidinblaustreifens eine deutliche metachromatische Zone. Die Laufzeit betrug durchweg 50 Min. In dem kathodennächsten Streifen trat die Metachromasie nach 20 Min. auf (1/1; Ausschnitt)

in bestimmten Abständen vom Startpunkt an drei Stellen Toluidinblau aufgetragen. Eine stärker konzentrierte Heparinlösung durchwandert unter Bildung einer metachromatischen Zone mehr Streifen als eine schwächere Lösung. Es sind zudem auch Verschiedenheiten der Anfärbung des Toluidin-Heparin-Komplexes bei der Heparinfärbung zu beobachten.

4. Reaktion Heparin — Protaminsulfat

a) *Heparinwanderung gegen Protaminsulfat verschiedener Konzentration:* Am Startpunkt wird eine Heparinlösung und in einem gewissen Abstand anodenwärts Protaminsulfat verschiedener Konzentration aufgetragen. Als Indikator für die Laufzeit dient das Auftreten einer metachromatischen Zone im Toluidin-

blau, welches weiter anodenwärts vom Protaminsulfat aufzutragen ist. Anschließend Beobachtung der nach Durchwandern des Protaminareals resultierenden Metachromasie. Die Laufzeit nimmt mit Durchwandern einer zunehmenden Protaminkonzentration zu. Bemerkenswert ist in Analogie zum Heparin-Toluidinblau-Komplex die gute Anfärbbarkeit des Heparin-Protamin-Komplexes bei der Heparinfärbung (Abb. 18—22).

Abb. 18: Am Startpunkt werden 0,05 ccm eines 2 E Heparin/ccm enthaltenden Albumin-γ-Globulin-Gemisches und in einer Entfernung von 4 cm 0,05 ccm Protaminsulfat in steigender Konzentration aufgetragen. 5,5 cm von der Heparinauftragungsstelle schließlich 0,015 ccm einer 50mg%igen Toluidinblaulösung. Zusätzliche Eiweißfärbung. Im protaminfreien (Kontroll-)Streifen tritt eine metachromatische Zone nach 90 Min. auf. Mit steigender Protaminkonzentration nimmt die metachromatische Färbung im Toluidinblau ab. In der gewählten Versuchsanordnung unterbleibt bei Reaktion von 2 E/ccm Heparin und 200 γ/ccm Protamin (unterster Streifen) die metachromatische Reaktion. Hier reagieren somit 0,8 γ Heparin mit 10 γ Protaminsulfat. Die Laufzeit nimmt mit Durchwandern einer zunehmenden Protaminkonzentration (bei 50 γ 95 Min., bei 200 γ 150 Min.) zu. (2/3)

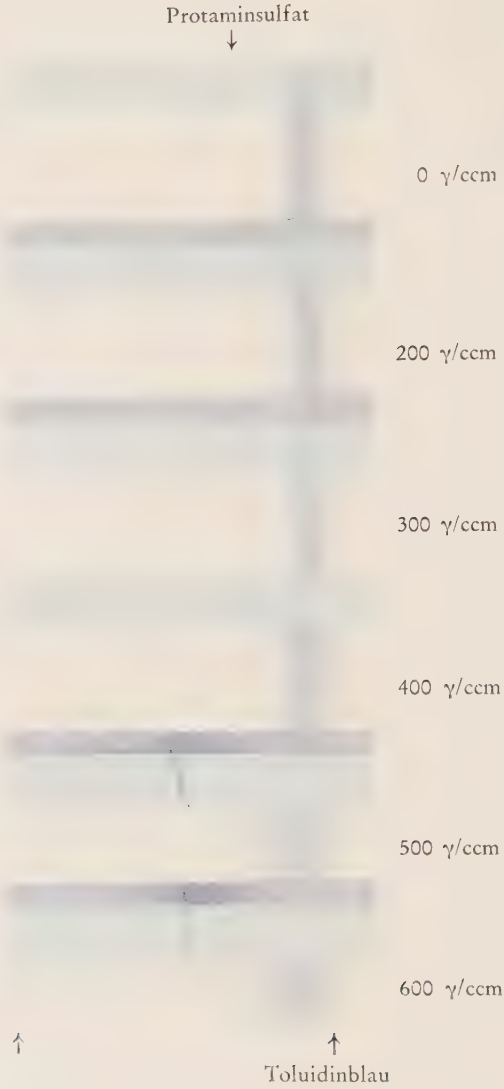


Abb. 19: Am Startpunkt werden 0,05 ccm einer wäßrigen 5 E Heparin/ccm enthaltenden Lösung, in einer Entfernung von 4 cm 0,05 ccm Protaminsulfat steigender Konzentration aufgetragen. 5,5 cm von der Heparinauftragungsstelle 0,015 ccm einer 50 mg-%igen Toluidinblaulösung. Zusätzlich Heparinfärbung und Eiweißfärbung. Auftreten der Metachromasie im protaminfreien (Kontroll-)Streifen nach 75 Min. Heparin passiert, z. T. in vermindertem Umfang, die Toluidinblauzone noch bis zu 300 γ/ccm Protaminsulfat. Bei 400 γ/ccm Protaminsulfat ist kein Durchwandern des Toluidinblaus mehr zu sehen, jedoch noch angedeutete Metachromasie. Hier reagieren 2 γ Heparin mit 20 γ Protaminsulfat. Protaminkonzentrationen von 500 γ und 600 γ/ccm (entsprechend 25 bzw. 30 γ Protaminsulfat) sind mit der *Eiweißfärbung* noch gut zu erfassen. Sie verhindern jede Metachromasie im Toluidinblau; das Heparin wird vielmehr bereits kathodenwärts von der Auftragungsstelle des Protaminsulfats vollkommen aufgefangen (3/4)

Abb. 20: Am Startpunkt wird eine wäßrige 10 E Heparin/ccm enthaltende Lösung und in einer Entfernung von 5,5 cm Protaminsulfat fallender Konzentration aufgetragen. Im obersten, protaminfreien Streifen wurden 11 cm vom Startpunkt 200mg%ige Toluidinblaulösung aufgetragen. Die Laufzeit bis zur Anfärbung des Toluidinblaus 9 cm vom Startpunkt entfernt beträgt hier 210/220 Min. 250 γ/ccm Protaminsulfat werden bereits teilweise durchwandert, wie die Heparinfärbung anodenwärts von der Protaminsulfat-Auftragungsstelle erkennen läßt. Hier reagieren 12,5 γ Protaminsulfat mit 4 γ Heparin. In dieser Relation wird Heparin nur unvollkommen abgefangen. — Die Anfärbung des Streifens bei der Heparinfärbung ist nach Durchwandern von 62,5 γ Protaminsulfat ausgeprägter als nach Durchwandern von 125 γ/ccm Protaminsulfat, erreicht aber nicht die Intensität des protaminfreien Streifens. Heparinfärbung, Eiweißfärbung (1/1)

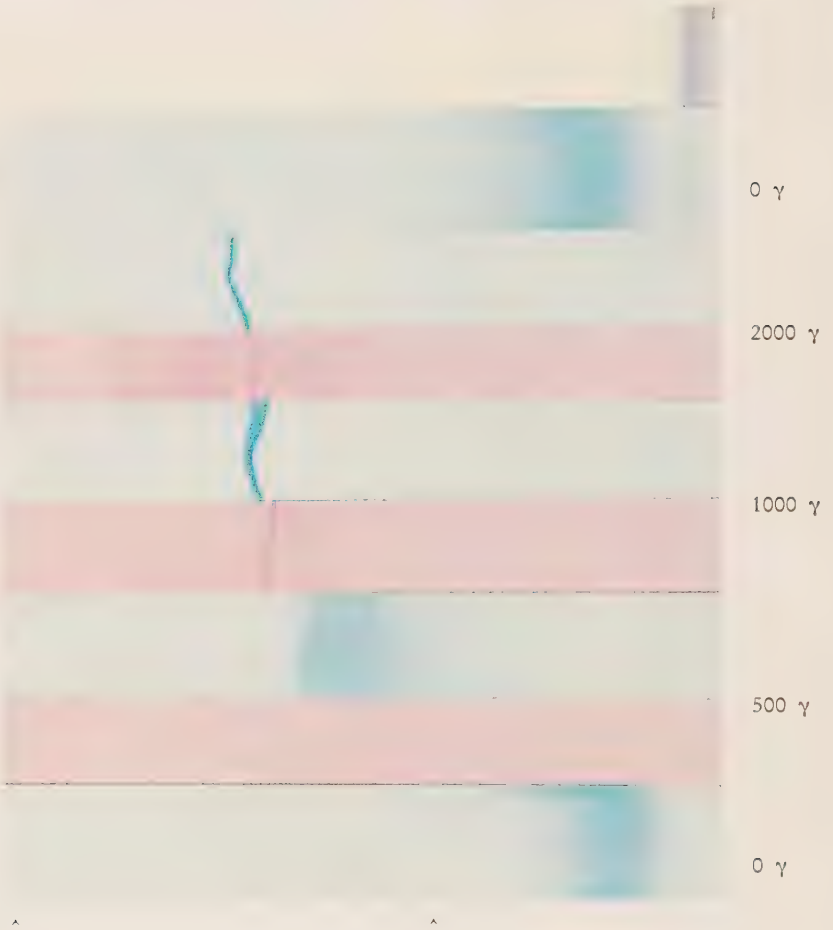


Abb. 21: Grundsätzlich gleiche Versuchsanordnung wie in Abb. 20. Am Startpunkt wurde eine wäßrige 20 E Heparin/ccm enthaltende Lösung aufgetragen, im Abstand von 5,5 cm Protaminsulfat fallender Konzentration. 200mg%ige Toluidinblaulösung wird im Abstand von 11 cm aufgetragen. Die Laufzeit bis zum Auftreten einer Metachromasie im obersten protaminfreien Kontrollstreifen als Indikator auch für die anderen Streifen betrug 195/210 Min. 20 E Heparin durchwandern zum Teil noch 500 γ/ccm Protaminsulfat entsprechend einer Reaktion zwischen 8 γ Heparin und 50 γ Protaminsulfat; nicht hingegen mehr 1000 γ/ccm Protaminsulfat (1/1)

Abb. 22: In der oberen Reihe sind 0,05 ccm einer 10 E Heparin/ccm enthaltenden wäßrigen Lösung, in der unteren Reihe 0,025 ccm einer 20 E Heparin/ccm enthaltenden wäßrigen Lösung aufgetragen. Im Abstand von 5,5 cm jeweils 1000 γ/ccm Protamin. Die verschiedene Konzentration der aufgetragenen Heparinlösung ist, obgleich die absolute Menge der Reaktionsteilnehmer unverändert bleibt (verschiedene Breite der metachromatischen Zone!), nicht belanglos

b) *Wanderung eines Heparin-Protaminsulfat-Komplexes:* 20 E Heparin + 2000 γ Protaminsulfat wurden 1 ccm Aqua dest. bzw. Albumin-γ-Globulin-Gemisch und Normalplasma zugesetzt und dann das elektrophoretische Verhalten dieses Gemisches beobachtet. Während der Heparin-Protaminsulfat-Komplex im wäßrigen Medium im elektrischen Feld nicht wandert, findet sich im proteinhaltigen Medium noch eine geringfügige Wanderung (Abb. 23). Wird hingegen im wäßrigen Milieu ein Komplex bei Heparin- oder Protaminsulfatüberschuß gebildet, so wandern die überschüssigen Komponenten entsprechend ihren Eigenschaften (Abb. 24).

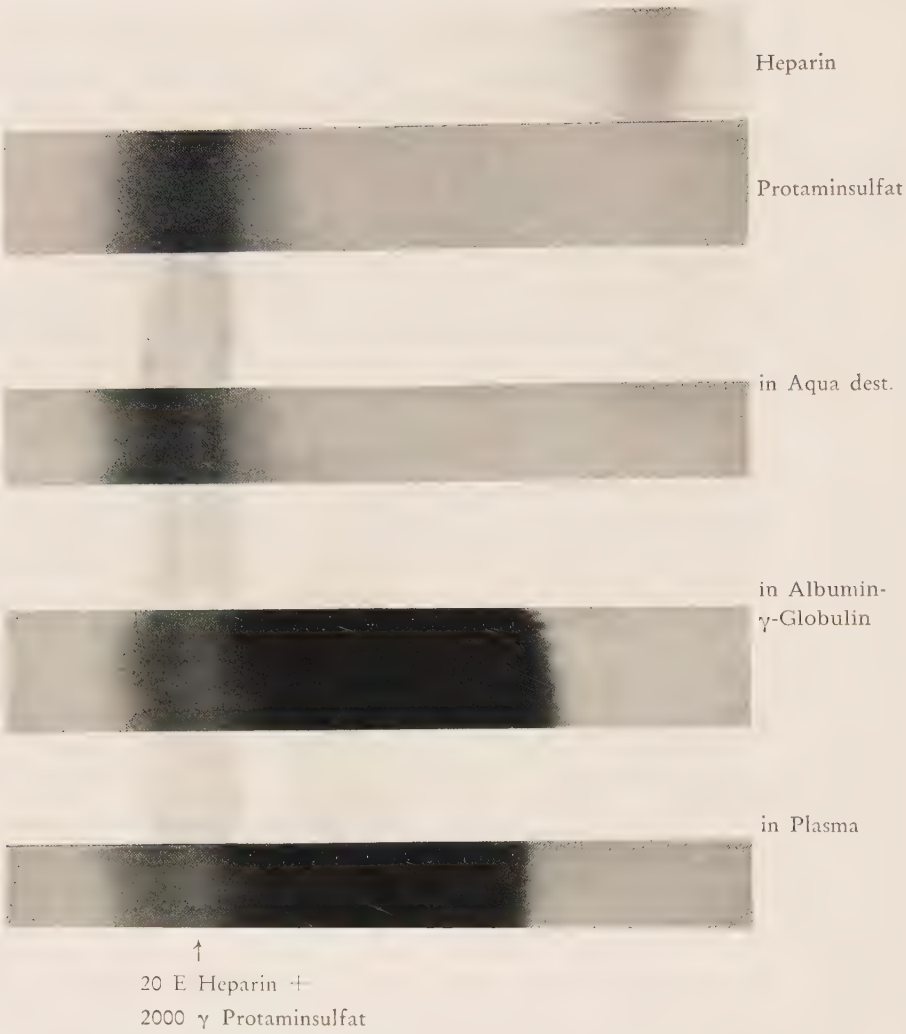


Abb. 23: Ein Gemisch von 20 E Heparin + 2000 γ Protaminsulfat wird in 1 ccm Aqua dest., in 1 ccm Albumin-γ-Globulin-Gemisch und 1 ccm Normalplasma am Startpunkt aufgetragen. Zum Vergleich: Heparin und Protaminsulfat in der angegebenen Konzentration jeweils für sich. Heparinfärbung und Eiweißfärbung (Amidoschwarz). Das Heparin-Protamin-Inkubat wandert in Aqua dest. nicht. Im Albumin-γ-Globulin-Gemisch, aber auch im Normalplasma, wird etwas anfärbbare Substanz mitgenommen Es läßt sich aber nicht entscheiden, ob dies freies Heparin oder ein Heparin-Protamin-Komplex ist, da Anfärbung in jedem Fall erfolgt (1/1; Ausschnitt)

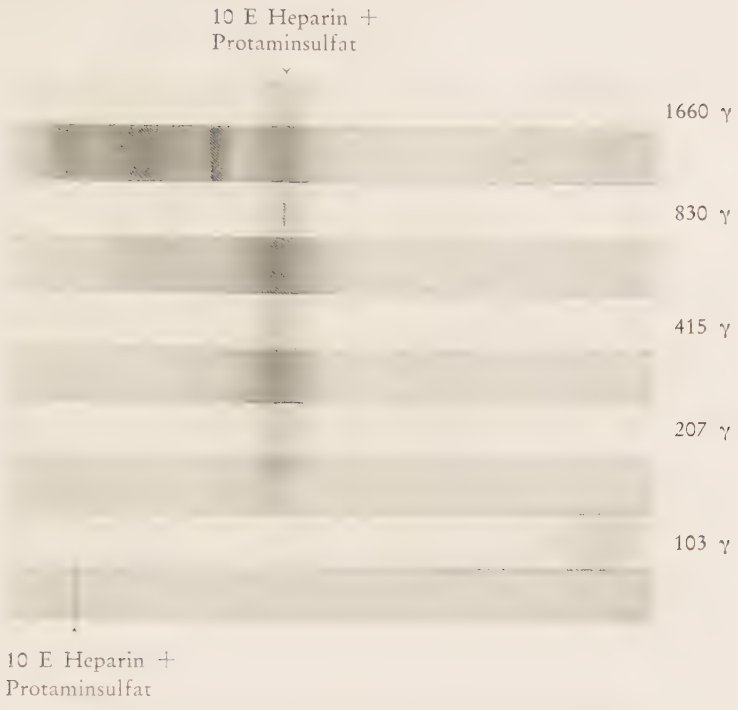


Abb. 24: Am Startpunkt wird ein Heparin-Protaminsulfat-Komplex nach Reaktion von jeweils 10 E Heparin mit (von oben nach unten) 1660 γ, 830 γ, 415 γ, 207 γ und 103 γ Protaminsulfat in wäßriger Lösung aufgetragen. Überschüssiges Heparin wandert anodenwärts, deutlich sichtbar in der untersten Reihe bei einer Relation 10 E Heparin zu 100 γ Protaminsulfat. An der Auftragungsstelle praktisch keine Heparinanfärbung mehr. Bei 1660 und 830 γ Protaminsulfat noch überschüssiges, kathodenwärts wanderndes Protaminsulfat. Es reagieren von oben nach unten jeweils 8 γ Heparin mit 160 γ, 83 γ, 41 γ, 20 γ, 10 γ und 5 γ Protaminsulfat. (7/10; die beiden unteren Streifen sind im Original um 35 mm nach links versetzt)

5. Reaktion Heparin — Thrombin

Wie aus Abbildung 2 und 25 hervorgeht, wandert Thrombin langsamer als Heparin. Es muß deshalb vom Heparin eingeholt bzw. überholt werden. Am Startpunkt werden wäßrige Heparinlösung und 2 cm anodenwärts Thrombinlösungen aufgetragen. Die Wanderung des Heparins wird durch Thrombin vergleichsweise verzögert, die des Thrombins durch Heparin beschleunigt. Dieses Ergebnis war allerdings in dieser Klarheit bei analoger Versuchsanordnung nicht immer zu reproduzieren. Bei Ersatz von Thrombin durch γ-Globulin fehlte der beschriebene Effekt auf das Heparin immer.

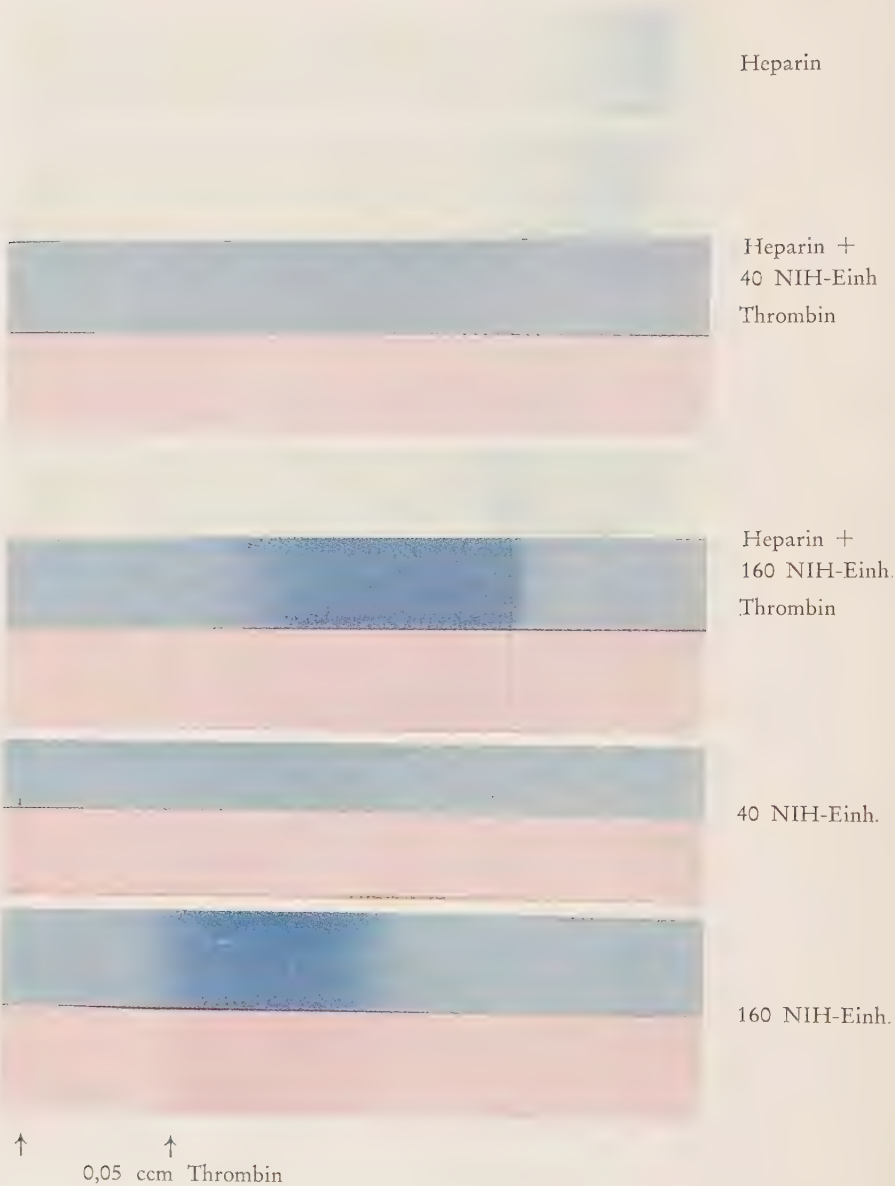


Abb. 25: Am Startpunkt werden 0,05 ccm einer wäßrigen 5 E/ccm Heparin enthaltenden Lösung und 2 cm anodenwärts 0,05 ccm Thrombin (40 NIH-Einh./ccm und 160 NIH-Einh./ccm) aufgetragen. 40 NIH-Einh. Thrombin verzögern die Heparinwanderung, verglichen mit den obersten thrombinfreien Heparin-(Kontroll-)Streifen, angedeutet, 160 NIH-Einh. Thrombin deutlicher. Neben der Heparinfärbung findet sich zur Darstellung des Thrombins noch die Eiweißfärbung mit Amidoschwarz und Azokarmin (1/1)

6. Heparinnachweis im Plasma und Serum

Wie unter 1e bemerkt, vermißt man unter den angegebenen Versuchsbedingungen die Ausbildung einer deutlich sichtbaren metachromatischen Zone nach Injektion von 5000—20 000 E Liquemin. Das gleiche gilt für Zugabe einer entsprechenden Heparinmenge zu Plasma bzw. Serum in vitro. Wir haben in diesem Zusammenhang noch folgende Versuche durchgeführt:

a) *Metachromasie bei fallender Heparinkonzentration im Plasma:* Während 5—2 E/ccm Heparin noch eine Metachromasie erkennen lassen, gelangt diese bei Inkorporation von 1 E/ccm Plasma nicht mehr zur Darstellung (Abb. 26).

b) *Metachromasie durch konstante Heparinmenge in zunehmender Plasma- bzw. Serumverdünnung:* Abbildung 27 und 28 zeigen, daß 2 bzw. 0,5 Einheiten Heparin/ccm Plasma und Serum mit *steigender Verdünnung eine bessere* Metachromasie ergeben. Zum Erreichen eines bestimmten Metachromasiegrades ist eine höhere Plasma- als Serumverdünnung erforderlich. Bei $^1/_{12}$ Verdünnung von

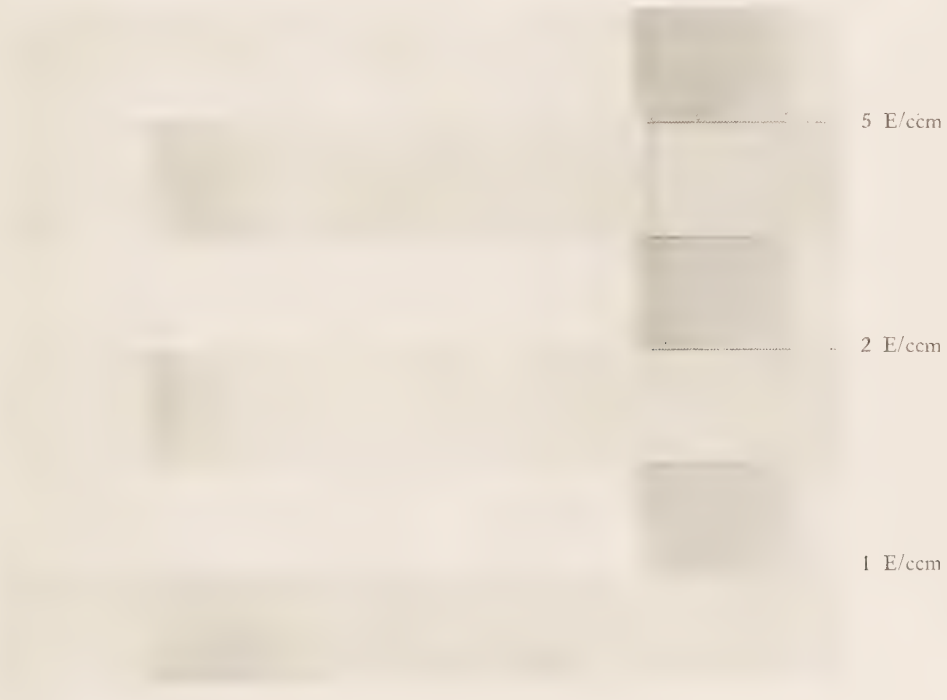


Abb. 26 (Legende s. Text)

Plasma und Serum entsprechen die Werte annähernd den Leerwerten, d. h. mit physiologischer Kochsalzlösung erhaltenen Werten.

c) *Metachromasie einer konstanten Heparinmenge in physiologischer Kochsalzlösung, Albumin-γ-Globulin-Gemisch und Plasma:* Verfolgt man die Ausbildung einer metachromatischen Zone in einem *Parallelansatz* (Abb. 29), so zeigt sich, daß der zu erwartenden Abnahme der metachromatischen Zone im Albumin-γ-Globulin-Gemisch, vor allem aber im Plasma, eine bei der Heparinfärbung gerade noch bzw. deutlich wahrnehmbare Heparinretention entspricht. Sie muß demnach nahezu selektiv in Fraktionen lokalisiert sein, die nicht zu dem von uns als Reagens verwandten Albumin-γ-Globulin gehören. Diese Retention ist übrigens auch in Abbildung 30 zu erkennen.

Abb. 27: Ausbildung der metachromatischen Zone bei zunehmender Verdünnung von Plasma und Serum. Es wurden 2 E/ccm Heparin in Plasma und Serum steigender Verdünnung (von links nach rechts $^1/_1$, $^1/_2$, $^1/_4$, $^1/_8$, $^1/_{12}$) aufgetragen. Man sieht, daß im Plasma eine Verdünnung auf $^1/_8$ erforderlich ist, um eine Metachromasie zu ergeben, die im Serum bereits mit einer Verdünnung auf $^1/_4$ erzielt wird (obere und untere Reihe). Um eine Metachromasie zu erreichen, wie sie der in physiologischer Kochsalzlösung auftretenden entspricht (ganz rechts), müssen Plasma und Serum auf $^1/_{12}$ verdünnt werden ($^1/_1$; Ausschnitte)

Abb. 28: Gleiche Anordnung wie Abb. 27, jedoch 0,5 E/ccm Heparin. Man erkennt allerdings nur mehr im durchfallenden Licht die Ausbildung einer metachromatischen Zone bei $^1/_{12}$ Plasma- und angedeutet schon bei $^1/_8$ Serumverdünnung. Im auffallenden Licht ist die Metachromasie erst im Leeransatz, und auch hier nur angedeutet sichtbar ($^1/_1$; Ausschnitt)

↑

Abb. 29: 2 E/ccm Heparin werden am Startpunkt in physiologischer Kochsalzlösung (oben), Albumin-γ-Globulin-Gemisch (Mitte) und Plasma (unten) aufgetragen. Abstand Heparin-Auftragungsstelle und Toluidinblau-Auftragungsstelle 10 cm. Die Metachromasie ist in physiologischer Kochsalzlösung stärker ausgeprägt, als im Albumin-γ-Globulin-Gemisch. Im Plasma ist sie am schwächsten zu sehen. Der abnehmenden Metachromasie im Bereich des Toluidinblaus entspricht eine Heparinretention im Bereich der Proteine. Selektiv färbt sich eine Fraktion an, die dem Plasma angehört (↗), nicht aber dem verwandten Albumin-γ-Globulin-Gemisch. Sie liegt zwischen dem γ-Globulin und dem Albumin (1/1; Ausschnitte)

Abb. 30: Gleicher Versuch, wie in Abb. 29 dargestellt. Die Heparinkonzentration beträgt 5 E/ccm Medium. Abstand Heparin-Auftragungsstelle Toluidinblau-Auftragungsstelle beträgt 12 cm (4/5; Ausschnitte)

D. Diskussion der Ergebnisse

Über Versuche, *Heparin im Sinne einer Heparinbestimmung elektrophoretisch* nachzuweisen — die Heparinelektrophorese wurde erstmals von Wilander (116) durchgeführt — liegen abgesehen von einer Mitteilung Bassiounis (5) u. W. keine detaillierten Angaben vor. Es mag dies auch daran liegen, daß die *Papierchromatographie bessere Aspekte* für eine Identifikation der metachromatischen Substanz bietet. Da Heparin bei weitem nicht die einzige chromotrope Substanz in Plasma oder Serum ist, waren bei Verzicht auf kompliziertere Technik die Aussichten, *allein auf Grund unmittelbarer Betrachtung* der Metachromasie zu quantitativ verwertbaren Aussagen über den Heparingehalt zu gelangen, nur sehr gering.

Immerhin schien es im Rahmen laufender Untersuchungen einer Prüfung wert, ob der *direkte elektrophoretische Nachweis* der Metachromasie im Hinblick auf eine zusätzliche Orientierung bzw. nähere „Definition" von gerinnungsanalytischen Resultaten *bessere Aspekte bietet* als die alles in allem enttäuschenden *Fällungsmethoden* (79, 92).

Das Auftreten der Metachromasie wurde zunächst in verschiedenen *proteinfreien* und dann *proteinhaltigen Systemen* untersucht.

Eine zusammenfassende Betrachtung unserer unter C 1 bis C 5 dargestellten Befunde ergibt: Die *Metachromasie* in der Toluidinblauzone *nimmt mit zunehmender Eiweiß-* (vor allem Albumin-) *Konzentration* ab. Zur Darstellung der Metachromasie eignete sich für die unmittelbare Betrachtung eine 50mg%ige Toluidinblaulösung am besten. Um eine optimale Metachromasie zu erzielen, muß man das Heparin eine Zeitlang in das Toluidinblau einwandern lassen; die Streifen dürfen nicht schon bei den ersten Anzeichen einer Metachromasie entfernt werden. Unter optimalen Bedingungen konnte in wäßriger Lösung sowie auch bei der Heparindirektfärbung *noch* $^1/_8$ *E Heparin/ccm*, entsprechend einer *absoluten Menge von 0,1* γ dargestellt werden.

Von besonderem Interesse war das elektrophoretische Verhalten der zwischen Toluidinblau, Protaminsulfat und Heparin gebildeten *Komplexe*.

Wie die Versuchsanordnung in den Abbildungen 12—17 zeigt, wandert Heparin in die *Toluidinblauzone* ein und bildet daselbst einen nicht nur *metachromatisch* zutage tretenden, sondern auch bei der Heparinfärbung sich besonders gut anfärbenden Komplex. Bei Heparinüberschuß wird diese Toluidinblau-

zone durchwandert und das Heparin ist, abgesehen von der Metachromasie, auch noch *anodenwärts* mit der Heparindirektfärbung gut darzustellen. In Abhängigkeit vom Verhältnis Heparin : Toluidinblau ist ein Kontrastverlust [„Subtraktionseffekt" (79)] festzustellen. Bei einer Relation Heparin : Toluidinblau = 1 : 8 bzw. 1 : 10 unterbleibt eine Durchwanderung.

Die Wanderungsgeschwindigkeit des Heparins wird, sofern Toluidinblau überhaupt durchwandert wird, nur wenig beeinflußt.

Gemäß Abbildung 14 ist *begrenzender Faktor* für die Entstehung einer optischer Wahrnehmung unmittelbar zugänglichen Metachromasie nicht nur, wie im vorhinein zu erwarten, eine niedrige Heparinkonzentration, sondern auch eine niedrige Toluidinblaukonzentration.

Die Beobachtungen bei Durchwandern *einer* Toluidinblauzone *variabler* Konzentration gelten in analoger Weise auch für das Durchwandern mehrerer „hintereinandergeschalteter" Toluidinblauzonen *gleicher* Konzentration durch variable Heparinmengen (Abb. 17).

Durchwandert Heparin eine *Protaminsulfatzone* (Abb. 18—24), so finden sich im Prinzip ähnliche Verhältnisse: Bei einer Relation Heparin : Protaminsulfat = 1 : 6 wird Protaminsulfat noch durchwandert. Die Protaminsulfatzone wird für Heparin bei einem Verhältnis 1 : 2 absolut „dicht". Hier ist bei entsprechender Anfärbung auch nur noch eine ganz geringfügige Infiltration festzustellen; man hat sogar den Eindruck, daß das Heparin durch das kathodenwärts wandernde Protaminsulfat direkt aufgehalten wird. Auch hier ist, wie zu erwarten, nach Durchwandern der Protaminsulfatzone ein Subtraktionseffekt zu erkennen, und zwar schon bei vergleichsweise niedrigen Protaminkonzentrationen, etwa bei einer Relation von Heparin : Protaminsulfat = 4 : 3.

Die längere Laufzeit (z. B. in Abb. 18) könnte Folge längerer Verweildauer des Heparins in der Protaminsulfat- bzw. Toluidinblauzone infolge veränderter Ladung eines hierbei entstehenden Komplexes sein. Es könnten auch die schneller durchwandernden Heparinfraktionen in den Toluidinblau- bzw. Protaminsulfatzonen „herausgefiltert" (79) worden sein.

Verfolgt man das Verhalten eines vorgängig *in vitro gebildeten Komplexes*, so läßt sich bei einer Relation von 8 γ Heparin zu 100 γ Protamin in physiologischer Kochsalzlösung keinerlei Beweglichkeit nachweisen. Bei Reaktion dieser Körper im Plasma wandert eine geringe Menge mit der Heparinfärbung erfaßbaren Materials mit dem Plasma. Auf Grund unseres Vorgehens ließ sich jedoch nicht entscheiden, ob es sich um Heparin oder einen Komplex handelt, da in beiden Fällen Anfärbbarkeit gegeben ist (Abb. 23). Bei *Überwiegen eines Reaktionsteilnehmers* wandert dieser Überschuß im elektrischen Feld (Abb. 24). Der färberische Nachweis setzt naturgemäß ein gewisses Überschußminimum voraus.

Jedenfalls entspricht die klinisch bekannte Relation eines 2- bis 3fachen Protaminbedarfs zur Neutralisierung des Heparineffektes (80) nicht dem elektrophoretisch wirksamen neutralisierenden Verhältnis, welches nach unseren Beobachtungen bei 10 : 1 liegt.

Aus Abb. 25 könnte bis zu einem gewissen Grade eine besondere Affinität zwischen *Heparin und Thrombin* herausgelesen werden. Diese Beobachtungen sind aber nicht ausreichend reproduzierbar, um hier diskutiert zu werden.

Injiziert man einem Patienten 10 000 E, d. h. angenähert 2 E Heparin pro ccm Blut, so vermißt man eine deutliche Ausbildung einer metachromatischen Zone, bei Injektion von 5000 E entfällt sie völlig. Das würde bedeuten, daß zumindest vom Plasma 1 E Heparin/ccm absorbiert wird. Bei Heparinzugabe in vitro sind die Verhältnisse vergleichbar (Abb. 26). *Plasma bzw. Serum enthalten somit eine heparinbindende Eiweißfraktion*, die dem von uns verwandten Albumin-γ-Globulin-Gemisch fehlt.

In Tabelle 2 ist die *Komplexbildung zwischen Heparin und Toluidinblau* in Analogie zu der bei unseren elektrophoretischen Untersuchungen gewählten Anordnung *in vitro* in Anwesenheit von Eiweißkörpern (Abb. 31) gemessen* worden. Je höher die gemessenen Werte, desto mehr Toluidinblau reagiert mit Heparin, und umgekehrt. Man erkennt, daß mit sinkendem Proteingehalt die Extinktionswerte zunehmen, daß mehr Komplex ausgefallen ist. Die Reaktion zwischen Toluidinblau und Heparin wird in Anwesenheit von Proteinen offenbar erschwert.

Tab. 2: Bildung eines Heparin-Toluidinblau-Komplexes in vitro; Erläuterung s. Text und Legende zu Abb. 31. Extinktion des proteinfreien Leeransatzes 0,34

Protein	8%	4%	2%	1%
Albumin	0,074	0,130	0,14	0,21
Globulin	0,12	0,17	0,18	0,18
Thrombin	0,15	0,18	0,19	0,22
Fibrinogen			0,06	0,16

Tab. 3: Bildung eines Heparin-Toluidinblau-Komplexes in vitro. Extinktion des Kontrollwertes 0,34. Erläuterung s. Text und Legende zu Abb. 31

	100%	50%	25%	12,5%
Serum	0,036			0,126
Plasma	0,024	0,078	0,086	0,104

* s. Legende f. Abb. 31.

In diesem Sinne ist *Albumin* und besonders *Fibrinogen* am wirksamsten *Thrombin* scheint etwas schwächer wirksam zu sein als γ-Globulin.

Die in analoger Weise für *Serum und Plasma* ermittelten Werte (Tab. 3) sprechen für eine *unvergleichlich höhere Beeinträchtigung der Komplexbildung zwischen Heparin und Toluidinblau.* Selbst eine Plasmaverdünnung auf $^1/_8$ ist noch wirksamer als eine *4%ige Albuminlösung* oder *8%ige Globulinlösung* Plasma behindert diese Komplexbildung mehr als Serum.

Abb. 31: Ansatz: 2 ccm verschieden konzentrierter Albumin- und γ-Globulinlösung (in Trispuffer pH 8,6) + 4 E Liquemin + 0,3 ccm Toluidinblau 100mg%ig. In diesem System fällt nach einiger Zeit ein Niederschlag aus. Nach 24 Stunden wird scharf zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit abpippetiert und nach Zugabe von 5 ccm absoluten Alkohols und 0,5 ccm n/10 NaOH Messung der Extinktion mit Filter S 53

Der im Plasma und im Serum vorhandene, den Ausfall des Toluidin-Heparin-Komplexes verhindernde Eiweißkörper ist offenbar von geringer Konzentration, aber enorm wirksam. Überträgt man diese Verhältnisse auf das Pherogramm, dann wird das Ausbleiben einer Metachromasie verständlich. Sie tritt erst bei *erheblichen Plasma- und Serumverdünnungen auf* (Abb. 27 und 28). Die entsprechende *Fraktion des Plasmas bzw. Serums und Heparin lassen sich elektrophoretisch nicht trennen.*

Das den Proteinfraktionen im elektrischen Feld vorauseilende (freie) Heparin ist offenbar überschüssiges, erst nach Absättigung der betreffenden Fraktionen verfügbares.

Die Abbildungen 26, 29 und 30 zeigen, daß an bestimmter Stelle im Eiweißspektrum Heparin selektiv festgehalten wird. Es muß sich hierbei um eine *zwischen den Albuminen und den γ-Globulinen wandernde Fraktion* handeln.

Konkretere *Angaben über die Heparinbindung im Plasma* liegen nicht vor. Es wird meist die Bindung von Heparin an den Heparinkofaktor, der mit dem *Antithrombin II* identisch sein soll und eine elektrophoretische Beweglichkeit wie α_2-*Globulin* hat, diskutiert (15, 16, 72). Daneben existiert sicher noch eine Bindung des Heparins an die Lipoproteinfraktion des Serums und an das Fibrinogen (39). Der bisher am besten charakterisierte Heparinkofaktor ist das von S n e l l m a n u. Mitarb. aus Gewebsmastzellen isolierte *Lipoprotein,* welches das Heparin besonders stark bindet (106).

Wenn man voraussetzt, daß *gerade das an seine Kofaktoren gebundene Heparin* von entscheidender biologischer Bedeutung ist (79), dann muß man zu dem Schluß gelangen, daß ein elektrophoretischer Heparinnachweis in seiner einfachsten Form, d. h. im nicht vorbehandelten Plasma oder Serum, allenfalls qualitativ befriedigt. Dies trifft vermutlich aber ganz allgemein und wahrscheinlich auch in noch höherem Maße auf alle (metachromatischen) Nachweisversuche *kleiner* Heparinmengen im Anschluß oder nach vorangehender *Eiweißfällung* zu, solange auf eine tryptische Verdauung der Eiweißkörper verzichtet wurde. Es hat sich nämlich gezeigt, daß unter diesen Umständen eine *unkontrollierbare* und *nie voll reproduzierbare,* da innerhalb erstaunlich weiter Grenzen *variierende Heparinmenge* (92) *im Zuge der Eiweißfällung verlorengeht.* Von diesen unkontrollierbaren Verlusten wird das freie Heparin, d. h. *elektrophoretisch abtrennbare Heparin, wohl nicht* betroffen (79).

Für Heparinmengen einer Größenordnung des endogenen Heparins, das ja wohl an den Komplex gebunden sein dürfte, sind all diese Methoden also nicht ohne weiteres brauchbar, es sei denn, es gelingt, das *Heparin* — etwa durch tryptische Verdauung der Proteine (79) — *von seinen ihm zugeordneten Eiweißfraktionen zu trennen.*

*

Die auf Grund unmittelbarer Betrachtung der Metachromasie im auffallenden, aber auch durchfallenden Licht noch zu erfassenden Heparinmengen sind zwar erstaunlich niedrig (0,1—0,5 γ), *gerinnungsanalytische* Methoden scheinen nach wiederholt angesetzten Parallelbestimmungen aber doch *empfindlicher.*

Man muß hierbei allerdings in Kauf nehmen, daß *alle* unter einer Heparinbelastung bestimmten Reaktionszeiten *nur zum Teil Schlüsse auf das (endogene) Heparin zulassen* (10, 91, 112).

Andererseits muß auch die Metachromasie gebende Substanz *keinesfalls mit Heparin identisch sein.* Teilt das Heparin doch die meisten seiner Eigenschaften

mit vielen anderen Substanzen, insbesondere *Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat A, Chondroitinsulfat B* usw. Der Mukopolysaccharidspiegel des Serums liegt bei 0,7 mg% (14).

Viele der sogenannten Heparinbestimmungsmethoden unterscheiden überdies nicht zwischen Heparin und seinen Stoffwechselprodukten bzw. inaktiven Formen. Somit ist eine Voraussetzung für die exakte, quantitative Heparinbestimmung die *Identifizierung* der gewonnenen Substanz als Heparin. Hier hat sich u. a. die Chromatographie (24, 117) bewährt. Übrigens kann selbst NaCl infolge seiner coagulotropen Eigenschaften (z. B. 99) eine Heparinaktivität bei vielen der für die Heparinbestimmung herangezogenen Teste vortäuschen.

E. Zusammenfassung

1. Heparin und Toluidinblau wandern bei der Papierelektrophorese entsprechend ihrer Ladung gegensinnig.

Bei Zusammentreffen von Heparin und Toluidinblau entsteht eine scharf begrenzte *metachromatische* Zone. Die metachromatische Verfärbung war in einer 50mg%igen Toluidinblaulösung am besten zu erkennen.

Bei unmittelbarer Betrachtung lassen sich in wäßriger Lösung Heparinkonzentrationen bis zu 1/8 E/ccm nachweisen. Dies gilt auch für die Heparin-*direktfärbung* des Elektrophoresestreifens.

Begrenzender Faktor für die unmittelbarer Betrachtung zugängliche Metachromasie ist die Heparin- und Toluidinblaukonzentration.

2. Variationen der Konzentration von Heparin, Toluidinblau und Protaminsulfat lassen sich im Sinne einer *„elektrophoretischen Titration"* ausbauen. Das Verhältnis der elektrophoretischen Neutralisation beträgt für Heparin und Toluidinblau etwa 1 : 8—10, für Heparin und Protaminsulfat etwa 1 : 10—12.

3. Mit steigendem *Albumin-* und *γ-Globulin*-Gehalt der Heparinlösung — allerdings bei vergleichsweise hohen Konzentrationen von 6% und mehr — nimmt die Metachromasie ab.

Fibrinogen wies in Konzentrationen bis zu 1000 mg% allein und bis zu 300 mg% in Kombination mit Albumin oder Globulin keinen sicher überlegenen Effekt auf.

4. Wird Heparin *Plasma* oder *Serum* zugefügt, so ergeben Konzentrationen bis zu 2 E/ccm keine bei unmittelbarer Betrachtung faßbare Metachromasie. Das gilt auch bei Injektion von 5000—10 000—20 000 E Heparin.

Die *„Retention"* des für die metachromatische Färbung offenbar fehlenden Heparins erfolgt vorwiegend in den *zwischen γ-Globulin und Albumin* wandernden Proteinen: Die Sättigungsfähigkeit der betreffenden Proteinfraktionen ist, verglichen mit Albumin und γ-Globulin, sehr groß.

Mit zunehmender Plasma- bzw. Serum*verdünnung* wird die Metachromasie demnach deutlicher.

5. Das im elektrischen Feld schneller als die Albumine wandernde Heparin ist *„freies Heparin"*, d. h. Heparin, soweit es nicht an die Eiweißkörper gebun-

den ist. Die bei der Elektrophorese immer unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen auftretende *Metachromasie* ist somit nicht Ausdruck *„gebundenen"* Heparins.

Zur Bestimmung niedriger Heparinkonzentrationen, insbesondere des endogenen Heparins, ist dieses Vorgehen allein aus diesem Grunde nicht geeignet.

6. Dieser sich auf die Erfassung des endogenen Heparins beziehende Einwand gilt für alle Methoden, bei denen es nicht gelingt, das Heparin von den „heparinspezifischen" Eiweißkörpern zu trennen.

7. Durch bestimmte, im Rahmen der Versuche angedeutete Modifikationen könnte indessen auch die Elektrophorese von Nativplasma bzw. Serum bei einfacher Versuchsanordnung weitere Aufschlüsse bieten und die üblichen Gerinnungsanalysen wertvoll ergänzen.

F. Literatur

(1) Allen, J. G., und L. O. Jacobsen: Science **105:** 388 (1947).
(2) Astrup, T.: Heparin Investigations. Store Nordiske Publishers, Kopenhagen 1944.
(3) Awe, W., und K. D. Stüdemann: Arzneimittelforsch. **VII:** 715 (1957).
(4) Bally, P. R.: Z. klin. Med. **148:** 295 (1951).
(5) Bassiouni, M.: J. clin. Path. **7:** 330 (1954).
(6) Bassiouni, M.: Ann. rheum. Dis. **14:** 288 (1955).
(7) Beilstein: Handb. d. Org. Chemie. 4. Aufl., Bd. XXVII, S. 402.
(8) Bell, F. K., und J. C. Krantz: J. Amer. Pharm. Ass. Sci. Ed. **39:** 94 (1950).
(9) Bell, H. J., und L. B. Jaques: Bull. Soc. chim. Belges **65:** 36 (1956).
(10) Beller, F. K., und J. Jürgens: Klinische Methoden der Blutgerinnungsanalyse Thieme, Stuttgart 1959.
(11) Beller, F. K., und W. Nagel: Med. Welt **1960:** 1863, 1928.
(12) Beller, F. K., und D. Steichele: Z. exp. Med. **128:** 458 (1957).
(13) Best, C. H.: Harvey Lectures **36:** 66 (1940).
(14) Bollet, A. J., M. W. Seraydarin und W. F. Simpson: J. clin. Invest. **36:** 1328 (1957).
(15) Burstein, M., und J. Loeb: C. R. Séance Acad. Sci. **239:** 904 (1954).
(16) Burstein, M., und J. Loeb: Rev. franç. Étud. clin. biol. **1:** 752 (1956).
(17) Cesnik, H., und L. Kronberger: Med. Welt **1961:** 490.
(18) Clarke, D. W., und F. C. Monkhouse: Canad. J. med. Sci. **31:** 394 (1953).
(19) Charles, A. F., und D. A. Scott: J. biol. chem. **102:** 425 (1933).
(20) Conn, H. J.: Biological Stains. 4th Ed. Humphrey Press, Genf 1940.
(21) Copley, A.: Science **93:** 478 (1941).
(22) Copley, A. L., und D. K. Whitney: J. lab. clin. Med. **28:** 762 (1943) und **29:** 117 (1944).
(23) Cornil, V.: C. R. Acad. Soc. 1875 [zit. nach (3)].
(24) Cramer, F.: Papierchromatographie. Verlag Chemie, Weinheim 1952.
(25) Deutsch, E.: Blutgerinnungsfaktoren. Deuticke, Wien 1955.
(26) Dick, W., P. Matis und W. Mayer: Chirurg **10:** 443 (1961).
(27) Ehrlich, P.: Arch. mikr. Anat. **13** (1877).
(28) Eiber, H. B., und I. Danishefsky: Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **94:** 801 (1957)
(29) Eiber, H. B., und I. Danishefsky: Arch. intern. Med. **102:** 189 (1958).
(30) Engelberg, H., A. Dudley und L. Freeman: J. Lab. clin. Med. **46:** 653 (1955).
(31) Fischer, A.: Biochem. Z. **278:** 133 (1935).
(32) Forster, R. H. K.: J. Amer. Pharm. Ass. **36:** 243 (1947) und **37:** 215 (1948).
(33) Freeman, L., R. Posthuma, L. Gordon und W. Marx: Arch. Biochem Biophys. **70:** 169 (1957).
(34) Gardell, S.: Arkiv Kemi **4:** 449 (1952).
(35) Gardell, S., und S. Rastgeldi: Acta chem. scand. **8:** 362 (1954).
(36) Gastpar, H., R. Blasiu und W. Seitz: Z. ges. exp. Med. **126:** 554 (1956).
(37) Gibson, R. B., T. L. Carr, S. Green und W. M. Fowler: Proc. Soc. exp Biol. (N.Y.) **79:** 577 (1952).
(38) Glick, D., und B. Sylvén: Science **113:** 388 (1951).
(39) Godal, H. C.: Scand. J. clin. Invest. **13:** 306 (1961)

(40) Gross, R., I. Heurer und K. Solth: Acta haemat. **16:** 147 (1956).
(41) Haley, Th. J., und Fr. Stolarsky: J. Amer. pharm. Ass. **39:** 76 (1950).
(42) Halse, Th.: Heparin, Heparinoide, Dicumarol. Hirzel, Stuttgart 1950.
(43) Hedenius, P.: Acta med. scand. Suppl. **109:** 1 (1940).
(44) Heremans, J. U., und J. P. Vaerman: Clin.-chim. Acta **3:** 430 (1958).
(45) Heschl: Wien. med. Wschr. **32:** 714 (1875).
(46) Hinger: Dissertation, Tübingen 1962.
(47) Holmgren, H., und O. Wilander: Z. mikr.-anat. Forsch. **42:** 242 (1937).
(48) Homan, J. D. H., und Lens: J. biochim. biophys. Acta **2:** 333 (1948).
(49) Jalling, O., J. E. Jorpes und G. Lindén: Quart. J. Pharm. **19:** 96 (1946).
(50) Jaques, L. B.: Biochem. J. **37:** 189 (1943).
(51) Jaques, L. B.: Amer. J. Physiol. **125:** 98 (1939).
(52) Jaques, L. B., und A. F. Charles: Quart. J. exp. Pharmacol. **14:** 1 (1941).
(53) Jaques, L. B., und A. G. Ricker: Blood **3:** 1197 (1948).
(54) Jaques, L. B., und H. Bell: Methods of biochemical analysis **VII:** 253 (1959).
(55) Jaques, L. B., M. Bruce Mitford und A. G. Ricker: Rev. Canad. Biol. **6:** 740 (1947).
(56) Jaques, L. B., F. C. Monkhouse und M. Stewart: J. Physiol. (London) **109:** 41 (1949).
(57) Jaques, L. B., E. T. Waters and A. F. Charles: J. biol. Chem. **144:** 229 (1942)
(58) Jensen, R., O. Snellman und B. Sylvén: J. biol. Chem. **174:** 265 (1948).
(59) Jorpes, E.: Naturwissensch. **23:** 196 (1935).
(60) Jorpes, J. E.: Heparin. 2nd Ed. Oxford, University Press, London 1946.
(61) Jorpes, E., und Bergström: Z. physiol. Chem. **244:** 253 (1936).
(62) Jorpes, J. E., M. Blombäck und B. Blombäck: J. Pharm. Pharmacol. **6:** 694 (1954).
(63) Jürgens, R.: Virchows Arch. path. Anat. **65:** 189 (1875).
(64) Jürgens, J.: Mat. med. Nordmark **8:** 10 (1956).
(65) Julen, Ch., O. Snellman und B. Sylven: Acta physiol. scand. **19:** 289 (1950)
(66) Koller, F.: Helvet. med. Acta, Series A **16:** 184 (1949).
(67) Lasch, H. G.: Habilitationsschrift, Heidelberg 1959.
(68) Lasch, H. G., und L. Róka: Z. Physiol. Chem. **294:** 30 (1953) und Klin. Wschr. **1954:** 460.
(69) Lasch, H. G., K. Mechelke und H. H. Sessner: in (88) S. 140.
(70) Lison, L.: Arch. Biol. (Liège) **46:** 599 (1935).
(71) Lison, L.: Bull. Sci. Acad. Roy. Belg. **20:** 1160 (1943).
(72) Loeb, J.: Arch. Sci. physiol. **10:** 129 (1956).
(73) MacIntosh, F. C.: Biochem. J. **35:** 776 (1941).
(74) MacLean, J.: Amer. J. Physiol. **41:** 250 (1916).
(75) Marbet, R., und A. Winterstein: Experientia **8:** 41 (1952); Helvet. chim. Acta **34:** 2311 (1951).
(76) Marbet, R., und A. Winterstein: Ärztl. Forsch. IX, **10:** 1460 (1955).
(77) Marx, R.: Arzneimittelforsch. **6:** 11 (1956).
(78) Marx, W., L. Marx, P. Rucker, L. Ruggerie und L. Freeman: Proc Soc. exp. Biol. (N. Y.) **94:** 217 (1957).
(79) Matis, P.: Pers. Mitteilung.
(80) Matis, P.: in (88) S. 317.
(81) Matis, P., K. Bauer und Ch. Rockstroh: N. Med. Welt **1950.**
(82) Matis, P.: Habilitationsschrift, Tübingen 1958.
(83) Merz, W.: Die Behandlung der Thrombose und Lungenembolie mit Antikoagulantien. S. Karger, Basel 1950.
(84) Meyer, K.: Physiol. Rev. **27:** 355 (1947).
(85) Meyer, K. H., und D. E. Schwartz: Helv. chim. Acta **33:** 1651 (1950); Experientia **6:** 332 (1950).

(86) Monkhouse, F. C.: Canad. J. Biochem. **34:** 757 (1956).
(87) Monkhouse, F. C., und L. B. Jaques: J. Lab. clin. Med. **36:** 782 (1950).
(88) Naegeli, Th., P. Matis, R. Gross, H. Runge und W. Sachs: Kurzes Handbuch der thromboembolischen Erkrankungen. 2. Aufl. Schattauer, Stuttgart 1960.
(89) Naegeli, Th., und P. Matis: Erg. Chir. **38:** 1 (1953).
(90) Naegeli, Th., und P. Matis: in (88) S. 261.
(91) Nagel, W., W. Mayer und P. Matis: Arzneimittelforsch. **10:** 99 (1960).
(92) Nagel, W.: Pers. Mitteilung.
(93) Nikkilä, E. A., und S. Majanen: Scand. J. clin. Lab. Invest. **4:** 204 (1952).
(94) Nilsson, I. M.: Acta med. scand., Suppl. **298:** 1 (1955).
(95) Nilsson, I. M., und A. Wenckert: Acta med. scand., Suppl. **297:** 1 (1955).
(96) Peterson, A. R., J. J. Conn und C. G. Melin: Stain Technology **9:** 154 (1934).
(97) Quick, A. J.: Amer. J. Physiol. **115:** 317 (1936).
(98) Reinert, M., und A. Winterstein: Arch. Intern. Pharmacodyn. **62:** 47 (1939).
(99) Ross, A.: Dissertation, Tübingen 1962.
(100) Sandritter, W., und H. D. Bergerhoff: Frankf. Zschr. Path. **65:** 127 (1954)
(101) Sandritter, W., M. Huppert und G. Schlüter: Klin. Wschr. **36:** 651 (1958)
(102) Scheiffarth, F., G. Berg und H. Götz: Papierelektrophorese in Klinik und Praxis. Urban & Schwarzenberg, München, Berlin 1962.
(103) Schmitz, A., und A. Fischer: Z. physiol. Chem. **216:** 264 (1933).
(104) Simon, K.: Mat. Med. Nordmark **1959:** 269.
(105) Snellman, O., R. Jensen und B. Sylvén: Nature **161:** 639 (1948).
(106) Snellman, O., B. Sylvén und C. Julen: Biochim. biophys. Acta **7:** 98 (1951)
(107) Soulier, J. P.: Sem. Hôp. (Paris) **27:** 775 (1951).
(108) Stender, A. St., O. Elbert und W. Sohre: Klin. Wschr. **1952:** 1021.
(109) Studer, A., und A. Winterstein: Helv. Physiol. Acta **9:** 6 (1951).
(110) de Takats, G.: J. Amer. med. Ass. **121:** 1246 (1943) und **142:** 527 (1950).
(111) Tocantins, L. M.: The Coagulation of blood, Methods of Study. Grune & Stratton, New York 1955.
(112) Usteri, C.: Dissertation, Zürich 1948.
(113) Wanner, J., und W. Zingg: Experientia **VI:** 299 (1950).
(114) Waugh, T. R., und D. W. Ruddick: Canad. med. Ass. J. **50:** 547 (1944).
(115) Wehrle, E., und R. Amann: Klin. Wschr. **34:** 624 (1956).
(116) Wilander, O.: Scand. Arch. Physiol. Suppl. **15:** 88 (1938).
(117) Williams, T. I.: An Introduction to Chromatography. Blackie and Son, London und Glasgow 1946.
(118) Winterstein, A.: Thromb. Diath. haem. **2:** 428 und 546 (1958), sowie in: Antikoagulantien in der Humanmedizin. Schattauer, Stuttgart 1961.
(119) Winterstein, A.: Persönliche Mitteilung.
(120) Witte und Dirnberger: Klin. Wschr. **1953:** 598.
(121) Witte, S., und K. Dirnberger: Schweiz. med. Wschr. **1954:** 800.
(122) Wolfrom, M. L., R. Monomery, J. V. Karabinos und P. Rathgelb: J. amer. chem. Soc. **72:** 5796 (1950).
(123) Zöllner, N., und J. Feeling: Naturwissenschaften **39:** 523 (1952) und Z. Naturforschg. **15:** 62 (1960).

Lebenslauf

Als Sohn des Dentisten Max Schmidl und seiner Ehefrau Emilie Schmidl, geb. Pannhans, wurde ich am 18. Juli 1923 in Preßnitz geboren. In meiner Heimatstadt besuchte ich die Volks- und Bürgerschule und anschließend das Realgymnasium in Kaaden. Im Jahre 1942 legte ich dort die Reifeprüfung ab und immatrikulierte an der Karls-Universität zu Prag, für allgemeine Medizin. Kurz darauf wurde ich zum Wehrdienst eingezogen.

Nach dem Zusammenbruch fand ich 1946 in Regensburg Aufnahme und es gelang mir 1947 mein Studium an der damaligen Außenstelle der Medizinischen Fakultät der Universität München, in Regensburg aufzunehmen. Hier legte ich mein Vorphysikum und das Physikum ab und setzte mein Studium in Erlangen fort, wo ich 1952 mein Staatsexamen ablegte.

Durch Herrn Prof. Jahn erhielt ich kurz nach meinem Examen eine Planstelle an der I. Med. Klinik der städt. Krankenanstalten zu Nürnberg, wo ich seither ab 1. Juni 1952, zuerst als Pflichtassistent, dann als Volontär bzw. Stationsarzt und jetzt als Oberarzt tätig bin. Seit 1956 beschäftige ich mich zunehmend mit Fragestellungen aus dem Bereich thromboembolischer Erkrankungen und pflegte einen Gedankenaustausch mit Herrn Doz. Dr. Matis.

In meiner Freizeit konnte ich mit Genehmigung des Herrn Direktors der Chirurgischen Universitätsklinik und unter Anleitung von Herrn Doz. Dr. Matis, meine Kenntnisse im Gerinnungslabor vertiefen, außerdem habe ich während zwei Semester einschlägige Vorlesungen belegt. Mein besonderes Interesse galt dabei den Fragen des Heparinnachweises. Im Laufe der letzten beiden Jahre habe ich elektrophoretische Untersuchungen mit diesem Ziel angestellt und diese zu einem vorläufigen Abschluß gebracht.

Herrn Hofrat Prof. Dr. W. Dick bin ich für die Genehmigung, im Gerinnungslabor seiner Klinik arbeiten zu dürfen, zu größtem Dank verpflichtet, desgleichen Herrn Prof. Dr. D. Jahn für sein allzeit förderndes Interesse. Herrn Dozenten Dr. P. Matis danke ich für wertvolle Diskussion und Hinweise im Zuge des Ausbaues meiner Untersuchungen und seine Anregung, diese Untersuchungen als Dissertation einzureichen. Herrn Oberarzt Dr. Nagel danke ich für wertvolle methodische Hinweise und Fräulein Karin Baumert für technische Hilfe und Ratschläge. Eine großzügige finanzielle Unterstützung durch Herrn Verleger F. K. Schattauer, dem ich an dieser Stelle nochmals danke, ermöglichte die Drucklegung der Dissertation in dieser Form.